



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**  
**PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**ORPA MIGUEL TIVANE**

**INTERAÇÃO ENTRE FUNGOS ENDOFÍTICOS MELANIZADOS SEPTADOS DA  
CAATINGA E GENÓTIPOS CONTRASTANTES DE *Vigna unguiculata* [L.] Walp.  
SOB DÉFICIT HÍDRICO**

**FORTALEZA**

**2026**

ORPA MIGUEL TIVANE

INTERAÇÃO ENTRE FUNGOS ENDOFÍTICOS MELANIZADOS SEPTADOS DA  
CAATINGA E GENÓTIPOS CONTRASTANTES DE *Vigna unguiculata* [L.] WALP. SOB  
DÉFICIT HÍDRICO

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Ceará, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Bioquímica, área de concentração em Fisiologia e Bioquímica Vegetal, para a obtenção do título de Mestre em Ciências (MSc).

Orientadora: Profa. Dra. Leticia dos Anjos

FORTALEZA

2026

ORPA MIGUEL TIVANE

INTERAÇÃO ENTRE FUNGOS ENDOFÍTICOS MELANIZADOS SEPTADOS DA  
CAATINGA E GENÓTIPOS CONTRASTANTES DE *Vigna unguiculata* [L.] Walp. SOB  
DÉFICIT HÍDRICO

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Ceará, como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Bioquímica, área de concentração em Fisiologia e Bioquímica Vegetal, para a obtenção do título de Mestre em Ciências (MSc).

Aprovada em: 10/04/2026.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dra. Leticia dos Anjos  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dra. Eva Gomes Moraes  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Wardsson Borges  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)

A minha filha, Lucilenn Shalom  
Aos meus pais, Miguel Tivane e Luísa Siteo Tivane

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a DEUS, pelo dom da vida, e por ter guiado os meus passos e dado forças sempre que achei que estivesse no meu limite, durante a minha formação acadêmica.

A professora Dra. **Letícia dos Anjos** e ao professor e pesquisador Dr. **Wardson Borges**, pela excelente orientação, atenção, paciência, cuidado e dedicação para que este trabalho se efetivasse.

Aos membros da banca de qualificação, Prof. Dr Humberto Henrique Carvalho, Prof. Dra. Aurenívia Bonifácio de Lima e Prof. Dra Eva Gomes Morais pelas contribuições para o melhoramento do meu trabalho.

Ao Grupo de Cooperação de Universidades Brasileiras de Mobilidade Internacional (GCUB), pela incrível oportunidade que me foi dada através da seleção no concurso do edital 001/2023. Muito obrigada por ter me dado a oportunidade de ver o mundo por outros ângulos, por me permitir ser o elo de intercâmbio Brasil-Moçambique e vice-versa, e poder contribuir para o desenvolvimento do meu país de origem, para o retorno.

Agradeço, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado-Código de financiamento: 88887.951620/2024-00.

A professora Anna Abrahão pela disposição em colaborar com este trabalho.

Agradeço a Universidade Federal do Ceará, ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela disponibilização da infraestrutura. Aos docentes do Programa que contribuíram para a minha formação profissional e pessoal, transmitindo me saberes acadêmicos e competências que ajudarão a enfrentar desafios e oportunidades da vida.

Expresso a minha gratidão ao coordenador do curso de Pós-graduação em Bioquímica Prof. Dr. Danilo Daloso pelas orientações e acompanhamento desde que ainda estava no meu país de origem até a minha chegada e integração no programa. Sua orientação e atenção fizeram uma grande diferença na minha adaptação e aprendizado, e sou muito grata por todo suporte e incentivo que recebi.

Ao corpo da secretaria do programa por sempre estarem disponíveis, para me auxiliar em caso de dúvidas ou inquietações sobre as diretrizes do curso.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), por me permitir realizar grande parte deste trabalho e pela disponibilização de materiais e equipamentos. Minha gratidão ao laboratório da microbiologia de solo (Embrapa), pela efetivação das primeiras três etapas deste trabalho, e aos seus integrantes Antônio Michel, Natanael da Silva, Naara Ximenes, Joseph Carrillo e Gabriel Silva, sem vocês esse trabalho não seria possível, grata pelos ensinamentos.

Aos laboratórios de Ecofisiologia vegetal e biotecnologia vegetal, por permitir a efetivação das análises da taxa de colonização das raízes, e aos seus estudantes Rodrigo Mesquita e Mariana Ribeiro pela ajuda durante essas atividades.

O meu muito obrigada ao laboratório Labplant por me permitir realizar as análises metabolômicas, em especial a Prof. Dra Eva Gomes, pelos ensinamentos nesta parte da pesquisa, pela disponibilidade, dedicação, carisma e pelo seu dom de ensinar. Aprendi muito.

Ao Mateus Siebra pela ajuda e auxílio nas análises estatísticas. Aos meus colegas de curso que levarei para vida, Edvânia Carvalho, Álife Diego, Deborah Douglas e Ádria Farias, sem vossa colaboração dentro e fora do universo acadêmico este percurso teria sido mais difícil, foi com vocês que conheci o Brasil e aprendi um pouco sobre a cultura brasileira. Foram o meu alicerce longe da minha família biológica, com eles chorei, dei as minhas maiores risadas e construí uma história linda registrada em fotos fora do continente africano. Obrigada por segurarem a minha mão nessa caminhada, especialmente a você Edvânia Carvalho. Gratidão.

Ao professor Sérgio e a Katherine Duarte pela ajuda e auxílio, na análise das trocas gasosas.

Ao meu amigo Luca, que me fez conhecer quase todos lugares turísticos de Fortaleza.

Aos meus vizinhos brasileiros, Jardel Fernandes, pelo acolhimento, Leyliane Bruno que cuidou de mim sempre que me encontrasse doente. A todos os africanos e estudantes da UFC, Van, Glasser, Evaristo, Farão Mané, Sergio Sabão, que me acolheram desde a minha chegada ao Brasil e facilitaram o meu processo adaptativo.

Aos meus pais Miguel Elias Tivane e Luísa Salazar Siteo Tivane, pelo apoio emocional e amor incondicional, pelas orações que tiveram fazendo por mim e por cuidarem da minha filha durante esses dois anos e dois meses que estive fora do convívio familiar. Vosso amor foi minha âncora perante várias tempestades. Sou e serei eternamente grata. Ao meu namorado Marcelino Sampaio pelo apoio, compressão e incentivo ao longo de todo percurso. A sua presença mesmo distante, foi fundamental para a realização deste trabalho.

A minha irmã Dulce Tozé, ao meu cunhado Tozé Tembe e Erílio Tivane pelo apoio e suporte.

Ao extinto administrador do distrito de Mandlakazi Carlos Biichir e aos Serviços Distritais Educação, Juventude e Tecnologia (SDEJT), por terem acreditado em mim, e me permitirem dar continuidade com os estudos. E pôr fim agradecer a todos que os seus nomes não estão referenciados acima, mas que participaram dessa caminhada direta ou indiretamente, o meu muito: Obrigada, (Kanimambo)!

“O Homem não teria alcançado o possível se, repetidas vezes, não tivesse tentado o impossível” (Max Weber).

## RESUMO

A seca é um dos principais estresses ambientais que limitam a produtividade agrícola, especialmente no Semiárido nordestino, onde culturas como o feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) possuem grande importância socioeconômica. Fungos endofíticos melanizados e septados (DSEs), têm sido associados à promoção de crescimento vegetal e à atenuação dos efeitos do déficit hídrico, porém sua funcionalidade em culturas agrícolas ainda é pouco compreendida. Este estudo avaliou o potencial de isolados de DSEs nativos da Caatinga em promover crescimento e contribuir para a tolerância ao estresse hídrico em genótipos contrastantes de *V. unguiculata*, Pingo-de-Ouro 1,2 (PO) e o Santo Inácio (SI). Dos 14 isolados, 14 colonizaram feijão-caupi e 11 colonizaram milho. Entre eles, a cepa DSE2 foi selecionada, por apresentar melhor desempenho na atenuação dos efeitos do estresse hídrico e na manutenção do crescimento vegetal. A inoculação com DSE2 resultou em maior taxa de colonização sob estresse hídrico, especialmente na cultivar susceptível (SI). Além disso, promoveu aumento da eficiência intrínseca do uso da água, com efeito mais pronunciado na cultivar tolerante (PO). O regime hídrico foi o principal fator determinante das alterações no metaboloma foliar e radicular, enquanto a inoculação com DSE2 exerceu efeito modulador secundário. No entanto, no sistema radicular da cultivar SI, a presença de DSE2 promoveu alterações metabólicas mais expressivas, indicando uma reprogramação metabólica associada a resposta ao estresse hídrico. Os resultados demonstram que DSEs nativos da Caatinga possuem potencial para modular respostas fisiológicas e metabólicas de *V. unguiculata* sob déficit hídrico, com efeitos dependentes do regime hídrico, do genótipo e do órgão analisado.

**Palavras- chaves:** Interação planta-microrganismo; promotores de crescimento; cepas fúngicas; déficit hídrico; tolerância.

## ABSTRACT

Drought is one of the main environmental stresses that limit agricultural productivity, especially in the semi-arid region of the northeast, where crops such as cowpea (*Vigna unguiculata*) have great socioeconomic importance. Melanized and septate endophytic fungi (DSEs) have been associated with plant growth promotion and the mitigation of water deficit effects, but their functionality in agricultural crops is still poorly understood. This study evaluated the potential of DSE isolates native to the Caatinga to promote growth and contribute to water stress tolerance in contrasting genotypes of *V. unguiculata*, Pingo-de-Ouro ,2 (PO) and Santo Inácio (SI). Of the 14 isolated species, 14 colonized cowpea and 11 colonized corn. Among them, the DSE2 strain was selected for showing the best effects of water stress and maintaining plant growth. Inoculation with DSE2 resulted in a higher colonization rate under water stress, especially in the susceptible cultivar (SI). Additionally, it promoted an increase in intrinsic water use efficiency, with a more pronounced effect in the tolerant cultivar (PO). The water regime was the main determining factor for changes in the leaf and root metabolome, while inoculation with DSE2 exerted a secondary modulatory effect. However, in the root system of the SI cultivar, the presence of DSE2 promoted more expressive metabolic reprogramming associated with the response to water stress. The results show that native DSEs from the Caatinga have the potential to modulate physiological and metabolic responses of *V. unguiculata* under water deficit, with effects depending on the water regime, genotype, and organ analyzed.

**Keywords:** Plant-microorganism interaction; growth promoters; fungal strains; water deficit; tolerance.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mapa de localização da área de coleta das amostras de solo da Região semiárida do Brasil no município de Pentecostes.....	20
Figura 2 – Representação esquemática do processo de isolamento dos DSEs.....	22
Figura 3 – Experimento para verificação da colonização dos DSEs nativos da Caatinga em <i>Zea mays</i> .....	23
Figura 4 – Plantas de <i>V. unguiculata</i> das cultivares Pingo de Ouro 1,2 (PO) e Santo Inácio (SI), inoculadas com as quatro cepas de DSEs .....	25
Figura 5 – Plantas de <i>V. unguiculata</i> das cultivares Pingo de Ouro 1,2 (PO) e Santo Inácio (SI), inoculadas com a cepa DSE2.....	26
Figura 6 – Taxa de colonização dos isolados de cepas de DSEs nativos da Caatinga em raízes milho ( <i>Zea mays</i> ) .....	29
Figura 7 – Crescimento das quatro cepas de DSEs selecionadas, em placa com meio MEA ao longo de sete dias.....	30
Figura 8 – Estruturas morfológicas das quatro cepas de DSEs.....	31
Figura 9 – Número de microescleródios de quatro cepas de DSE.....	34
Figura 10 – Número de clamidósporos de quatro cepas de DSE .....	36
Figura 11 – Plantas de <i>V. unguiculata</i> das cultivares Pingo-de-Ouro-1,2 (PO) e Santo Inácio (SI) submetidas a suspensão de irrigação por 3 e 10 dias.....	37
Figura 12 – Plantas de <i>V. unguiculata</i> das cultivares Pingo-de-Ouro-1,2 (PO) e Santo Inácio (SI) após serem seguidos de um período de recuperação de 3 dias e 7 dias.....	38
Figura 13 – Biomassa da parte aérea das plantas inoculadas com quatro cepas de DSE diferentes.....	41
Figura 14 – Razão biomassa seca da raiz/parte aérea (R/PA) de dois genótipos de <i>V. unguiculata</i> , inoculadas com quatro diferentes cepas de DSE.....	42
Figura 15 – Parte aérea e radicular de plantas de <i>V. unguiculata</i> das cultivares Pingo-de-Ouro - 1,2 (PO) e Santo Inácio (SI) após recuperação de sete dias do estresse hídrico moderado e severo.....	43
Figura 16 – Taxa de colonização nas raízes das plantas de <i>V. unguiculata</i> das cultivares Pingo -De-Ouro-1,2 (PO) e Santo Inácio (SI).....	45
Figura 17 – Plantas da cultivar de Santo Inácio (SI) e Pingo de Ouro 1,2 (PO) e Santo Inácio (SI) .....	46
Figura 18 – Comprimento do caule das plantas de <i>V. unguiculata</i> das cultivares Pingo de Ouro	

1,2 (PO) e (SI) Santo Inácio (SI).....	48
Figura 19 – Razão comprimento raiz/comprimento do caule das plantas de <i>V. unguiculata</i> das cultivares Pingo de ouro 1,2 (PO) e (SI) Santo Inácio (SI)....	50
Figura 20 – Área foliar das plantas de <i>V. unguiculata</i> das cultivares Pingo de Ouro 1,2 (PO) e Santo Inácio (SI).....	52
Figura 21 – Mudanças nas trocas gasosas em duas cultivares contrastantes SI e PO.....	54
Figura 22 – Heartmap de correlação entre amostras foliares de <i>Vigna unguiculata</i> .....	56
Figura 23 – Heatmap de correlação entre metabólitos foliares de <i>Vigna unguiculata</i> .....	57
Figura 24 – Análise de componentes principais (PCA) dos perfis metabólicos foliares de <i>V. unguiculata</i> .....	68
Figura 25 – Loadings da análise de componentes principais (PCA), indicando a contribuição dos metabólitos foliares de <i>V. unguiculata</i> .....	60
Figura 26 – Análise discriminante por mínimos quadrados parciais esparsos (sPLS-DA) dos perfis metabólicos foliares de <i>V. unguiculata</i> .....	61
Figura 27 – Metabólitos foliares de feijão-caupi, das cultivares Pingo de Ouro 1,2.....	63
Figura 28 – Níveis relativos dos metabólitos foliares de <i>Vigna unguiculata</i> , da cultivar Pingo de Ouro.....	64
Figura 29 – Distribuição dos níveis de metabólitos foliares de <i>Vigna unguiculata</i> , da cultivar Santo Inácio.....	66
Figura 30 – Heartmap de correlação entre amostras da radiculares de <i>Vigna unguiculata</i> , das cultivares Pingo de Ouro 1,2.....	68
Figura 31 – Heartmap de correlação entre amostras da radiculares de <i>Vigna unguiculata</i> , das cultivares Pingo de Ouro 1,2.....	69
Figura 32 – Análise de componentes principais (PCA) dos perfis metabólicos radiculares de <i>V. unguiculata</i> das cultivares Pingo de Ouro 1,2.....	70
Figura 33 – Gráfico de loadings da análise de componentes principais (PCA), indicando a contribuição dos metabólitos radiculares de <i>V. unguiculata</i> .....	72
Figura 34 – Análise discriminante por mínimos quadrados parciais esparsos (sPLS-DA) dos perfis metabólicos radiculares de <i>V. unguiculata</i> .....	74
Figura 35 – Metabólitos radiculares de <i>V. unguiculata</i> das cultivares PO e SI.....	75
Figura 36 – Distribuição dos níveis de metabólitos radiculares de <i>Vigna unguiculata</i> .....	76
Figura 37 – Distribuição dos níveis de metabólitos radiculares de <i>Vigna unguiculata</i> , da cultivar Santo Inácio.....	78

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Coordenadas geográficas dos pontos de coleta .....	21
Tabela 2 –Codificação dos isolados de cepas fúngicas de DSEs e descrição dos elementos elementos dos códigos.....	28
Tabela 3– Parâmetros do modelo Beta de taxa de colonização de plantas de <i>V. unguiculata</i> colonizadas com quatro cepas de DSE diferentes.....	32
Tabela 4 –Resultados da análise de variância para números microescleródios plantas de <i>V. unguiculata</i> colonizadas com quatro cepas de DSE diferentes.....	33
Tabela 5 –Resultados da análise de variância para números de clamidósporos plantas de <i>V. unguiculata</i> colonizadas com quatro cepas de DSE diferentes.....	35
Tabela 6 –Resultado da análise de variância (ANOVA) da biomassa da raiz de plantas de <i>V. unguiculata</i> colonizadas com quatro cepas de DSE diferentes.....	39
Tabela 7 – Biomassa seca da raiz, teste Tukey.....	40
Tabela 8 –Resultado da análise de variância (ANOVA) da biomassa da parte aérea de plantas de <i>V. unguiculata</i> colonizadas com quatro cepas de DSE diferentes.....	40
Tabela 9 –Resultado da análise de variância (ANOVA) da razão raiz/parte aérea de plantas <i>V. unguiculata</i> colonizadas com quatro cepas de DSE diferentes.....	42
Tabela 10 –Parâmetros de modelo beta para taxa de colonização com quatro cepas de DSE.....	44
Tabela 11 –Resultado da análise de variância (ANOVA) comprimento da raiz de plantas <i>V. unguiculata</i> colonizadas com cepa de DSE2.....	57
Tabela 12 –Resultado da análise de variância (ANOVA) comprimento do caule de plantas <i>V. unguiculata</i> colonizadas com cepa de DSE2.....	48
Tabela 13 –Resultado da análise de variância (ANOVA) de razão raiz/caule de plantas de <i>V. unguiculata</i> colonizadas com cepa de DSE2.....	49
Tabela 14 –Resultado da análise de variância (ANOVA) da área foliar de plantas de <i>V. unguiculata</i> colonizadas com uma cepa de DSE diferentes.....	51
Tabela 15 –Resultado da análise de variância (ANOVA) de trocas gasosas de <i>V. unguiculata</i> colonizadas com uma cepa de DSE. ....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
PGP	Promotores de Crescimento Vegetal
DSEs	Dark Septate Endophytes
AM	Fungos Micorrízicos Arbusculares
PO	Pingo de Ouro
SI	Santo Inácio
SOD	Superóxido Dismutase
CAT	Catalase
APX	Ascorbato Peroxidase
POD	Peroxidase
ABA	Ácido Abscísico
A	Fotossintética líquida
C <sub>i</sub>	Concentração intracelular de CO <sub>2</sub>
E	Taxa de transpiração
gs	Condutância estomática ao vapor de água
GC-MS	Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massas
PCA	Principal component analysis
PLS-DA	Partial least square discriminant analysis
VIP score	Variable Importance in Projection
KOH	Hidróxido de potássio
MEA	Extrato de Ágar e Malte
B.O.D	Biochemical Oxygen Demand
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
UFC	Universidade Federal do Ceará
OMM	Organização Meteorológica Mundial
ONU	Organização das Nações Unidas
IP	Índice Pluviométrico/
IA	Índice de Aridez
WW	Irrigação plena
WD	Estresse hídrico severo
GLM	Modelo linear generalizado
RMD	Estresse hídrico moderado

RSD	Estresse hídrico severo
R/PA	Razão raiz/parte aérea
RFO	Oligossacarídeos da família da rafinose
MDA	Malondialdeído

## LISTA DE SÍMBOLOS

g gramas

% porcentagem

uL microlitros

h hora

°C graus celsius

p probabilidade associada a estatística

mL mililitro

L litro

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	PERGUNTAS DE PARTIDA.....	18
3	OBJETIVOS.....	19
3.1	Objetivo Geral.....	19
3.2	Objetivos Específicos.....	19
4	HIPÓTESES.....	19
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	20
5.1	Estratégia Experimental.....	20
5.1.1	<i>Etapa 1: Coleta de solo contendo DSEs nativos da Caatinga.....</i>	20
5.1.2	<i>Etapa 2: Isolamento e seleção de cepas de DSEs.....</i>	21
5.1.3	<i>Etapa 3: Avaliação da recuperação pós-estresse hídrico em plantas de V. unguiculata inoculadas com cepas de DSE.....</i>	24
5.1.4	<i>Etapa 4: Respostas fisiológicas e metabólicas de V. unguiculata inoculada com DSE sob estresse hídrico.....</i>	26
5.1.5	<i>Análises Estatísticas.....</i>	27
6	RESULTADOS.....	28
6.1	Isolamento de cepas de DSEs da Caatinga capazes de colonizar <i>V. unguiculata</i> .....	28
6.2	Efeito da inoculação com quatro cepas de DSE na recuperação pós-estresse hídrico em <i>V. unguiculata</i> .....	30
6.3	Efeito do estresse hídrico na colonização radicular, no crescimento e nas trocas gasosas de <i>V. unguiculata</i> inoculada com a cepa DSE2 (F12.3F2A).....	44
6.4	Trocas gasosas das plantas.....	52
6.5	Efeito do estresse hídrico no metaboloma foliar de <i>V. unguiculata</i> inoculada com a cepa DSE2.....	56
6.6	Efeito do estresse hídrico no metaboloma radicular de <i>V. unguiculata</i> inoculada com a cepa DSE2.....	67
7	DISCUSSÃO.....	80
8	CONCLUSÕES.....	89
	REFERÊNCIAS.....	91
	APÊNDICE.....	99

## 1 INTRODUÇÃO

A seca é um importante estressor abiótico que limita o crescimento das plantas e a produção agrícola em regiões áridas e semiáridas de todo o mundo (Huang et al., 2016). A água compõe cerca de 80% a 95% da biomassa fresca das plantas e é essencial para processos fisiológicos fundamentais. Com as mudanças climáticas, secas mais intensas e frequentes têm sido registradas em diversas regiões, incluindo o Nordeste brasileiro (Buriti et al., 2020). O aumento da frequência e da intensidade das estiagens, associado ao crescimento populacional e à demanda por alimentos, representa uma ameaça à segurança alimentar, desafiando diretamente metas como Fome Zero da ONU para 2030 (FAO, 2017; Fujimori et al., 2019). No Brasil, o estado do Ceará está entre os mais afetados por eventos de seca recorrente (Seigerman et al., 2024), comprometendo a produtividade das culturas agrícolas e a subsistência de milhares de famílias. Neste contexto, torna-se urgente desenvolver estratégias para mitigar os efeitos das mudanças climáticas sobre as culturas agrícolas, especialmente em áreas como o Nordeste brasileiro, onde predomina a agricultura familiar, caracterizada por baixa infraestrutura e produtividade (Alvalá et al., 2019).

O déficit hídrico no solo imposto pela seca compromete processos fisiológicos essenciais na planta, afetando o metabolismo, a reprodução e o desenvolvimento vegetal (Chochave et al., 2019). Também intensifica produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que causam danos oxidativos a lipídios, comprometendo a integridade das membranas celulares, além de afetar proteínas, e ácidos nucleicos. Esses danos podem interferir em processos celulares essenciais, como a atividade enzimática, a replicação, e a transcrição contribuindo para alterações metabólicas e fisiológicas que prejudicam a fotossíntese, a respiração e o crescimento das plantas (Hasanuzzaman et al., 2017; Lata, 2018).

Diante dos impactos causados pela seca, muitas espécies vegetais desenvolveram estratégias adaptativas que envolvem mecanismos fisiológicos, bioquímicos e morfológicos, que permitem à planta manter suas funções vitais, mesmo sob baixa disponibilidade hídrica (Valliyodan & Nguyen, 2006). As plantas respondem ao estresse hídrico por meio de três mecanismos principais: escape, evitação e tolerância. É importante destacar que essas respostas não ocorrem de forma isolada, mas resultam da interação entre múltiplos mecanismos integrados de tolerância (Oguz et al., 2022). Fatores como a espécie, o estágio de desenvolvimento, a intensidade e duração da seca, além da interação com microrganismos que influenciam diretamente a eficácia dessas estratégias (Kumar et al., 2019).

As interações entre plantas e microrganismos da rizosfera são bem elucidadas e desempenham papel central na ecologia e evolução das plantas terrestres. Atualmente, essas interações têm sido exploradas como uma estratégia para aumentar a tolerância vegetal a estresses ambientais, incluindo o estresse hídrico. Microrganismos como fungos micorrízicos, leveduras e bactérias podem atuar como promotores de crescimento vegetal (PGP) e de tolerância das plantas à seca (Lata et al., 2018; Fitzpatrick, et al., 2019; Vidal et al., 2022). O uso de microrganismos como ferramentas biotecnológicas vem ganhando destaque em práticas agrícolas sustentáveis. Dentre os microrganismos que favorecem a adaptação vegetal ao estresse hídrico, destacam-se os fungos endofíticos melanizados escuros também conhecidos como DSEs (Dark Septate Endophytes). Os DSEs compreendem um grupo diversificado, generalista e onipresente de fungos, capazes de colonizar vigorosamente as raízes das plantas, especialmente em ambientes áridos e semiáridos (Malick et al., 2022, Huertas et al., 2024, Delattre et al., 2023). Os DSEs não são endofíticos obrigatórios e podem se associar de forma benéfica às plantas, promovendo o crescimento e a tolerância ao estresse em diferentes estágios do desenvolvimento vegetal (Alam et al., 2021). Eles possuem uma parede celular formada por quitina, glucanos e proteínas. Ainda, a parede celular desses fungos é rica em melanina, um pigmento polimérico que atua como antioxidante e confere resistência a estresses ambientais (Lopez et al., 2024a; Redman et al., 2002). Apesar do crescente interesse científico, a interação entre os DSEs e as plantas ainda é pouco compreendida. Ainda se conhece pouco sobre os mecanismos pelos quais esses fungos podem promover tolerância a estresses ambientais, bem como sobre em quais espécies vegetais e sob quais condições ambientais esses efeitos ocorrem (Mandyam e Jumpponen 2005; Bonfim et al., 2016; Spagnoletti & Giacometti 2020). Pouco se sabe sobre a diversidade e o potencial dos DSEs nativos da Caatinga, um bioma com ampla variabilidade climática e alto grau de endemismo. A investigação desses DSEs nativos pode revelar novas cepas com potencial de aplicação agrícola e de baixo custo, especialmente para sistemas agrícolas de base familiar. Neste contexto, esses fungos despontam como aliados estratégicos no desenvolvimento de tecnologias agrícolas mais sustentáveis, voltados à redução de insumos químicos e à promoção de culturas mais resilientes, particularmente diante das previsões de aumento da aridez no Nordeste brasileiro associadas às mudanças climáticas (Vergara et al. 2018).

A *V. unguiculata* é uma cultura de grande importância agrícola e nutricional para a região Semiárida do nordeste brasileiro, constituindo um dos principais componentes da alimentação da população e desempenhando relevante papel socioeconômico, especialmente em sistemas agrícolas de base familiar (Rivas et al., 2016). Apesar de apresentar maior

tolerância ao déficit hídrico quando comparado a outras culturas herbáceas, a produtividade de *V. unguiculata* ainda é fortemente afetada por condições de seca, baixa fertilidade de solo e limitações de manejo características de regiões semiáridas. Os genótipos Pingo de Ouro 1,2 (PO) e Santo Inácio (SI) foram selecionados por apresentarem comportamento contrastante em relação ao déficit hídrico, sendo o primeiro considerado tolerante e o segundo sensível a seca (Rodrigues et al., 2017). Para além dessa diferença, estes genótipos distinguem-se em aspectos fisiológicos, incluindo eficiência intrínseca do uso da água, trocas gasosas e capacidade de manutenção da atividade fotossintética sob condições de estresse. Neste contexto, o desenvolvimento de estratégias que aumentem a tolerância das plantas ao estresse hídrico é fundamental para reduzir perdas de produtividade e fortalecer a segurança alimentar em regiões vulneráveis, especialmente quando se tratam de soluções acessíveis, de baixo custo e reduzido impacto ambiental (Embrapa, 2016).

Nesse contexto, esta pesquisa investigou a interação entre fungos DSEs e plantas de *V. unguiculata*. Inicialmente foram obtidos isolados de DSEs a partir de solos nativos da Caatinga, os quais foram posteriormente avaliados quanto a capacidade de colonizar a raízes de *V. unguiculata* e promover crescimento das plantas sob condições de déficit hídrico moderado e déficit hídrico severo. Em seguida, foi analisado o potencial de um isolado em contribuir para a tolerância ao déficit hídrico, considerando alterações fisiológicas e metabólicas associadas a interação planta-fungo.

## **2 PERGUNTAS DE PARTIDA**

- ❖ Fungos DSEs isolados de solos da Caatinga são capazes de colonizar raízes de *V. unguiculata*?
- ❖ A colonização das raízes por DSEs atenua os efeitos do estresse hídrico e aumenta a tolerância à seca em plantas de *V. unguiculata*?
- ❖ A associação com DSEs promove uma recuperação mais eficiente de *V. unguiculata* após o estresse hídrico?
- ❖ Genótipos mais sensíveis à seca apresentam maior colonização radicular por DSEs e se beneficiam mais dessa interação simbiótica, em comparação à genótipos mais tolerantes?
- ❖ Como a colonização por DSEs influencia as respostas fisiológicas e metabólicas de *V. unguiculata* sob condições de irrigação e estresse hídrico?

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Identificar e avaliar o potencial de isolados de DSEs nativos da Caatinga em promover o crescimento e contribuir para a tolerância ao estresse hídrico em *V. unguiculata*.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- ❖ Avaliar a capacidade dos isolados de DSEs em colonizar as raízes de *V. unguiculata*.
- ❖ Avaliar se a inoculação com isolados de DSE contribui para uma recuperação mais rápida após estresse hídrico em *V. unguiculata*.
- ❖ Avaliar se a inoculação com isolados de DSE atenua os efeitos do estresse hídrico em *V. unguiculata*.
- ❖ Avaliar o efeito da colonização por DSEs nas respostas fisiológicas e metabólicas de plantas de *V. unguiculata* sob condições de irrigação e estresse hídrico.
- ❖ Avaliar se genótipos contrastantes de *V. unguiculata* quanto à sensibilidade ao estresse hídrico diferem na colonização por DSEs e na resposta à inoculação.

### 4 HIPÓTESES

- ❖ DSEs isolados de solo da Caatinga são capazes de colonizar raízes de *V. unguiculata*.
- ❖ A inoculação com DSEs favorece o crescimento e a recuperação de *V. unguiculata* após o estresse hídrico.
- ❖ A associação com DSEs atenua os efeitos do estresse hídrico, por meio de ajustes fisiológicos, bioquímicos e metabólicos.
- ❖ A taxa de colonização radicular por DSEs varia em função sensibilidade do genótipo, sendo mais pronunciada em plantas mais sensíveis à seca.
- ❖ A colonização por DSEs modula as respostas fisiológicas e metabólicas de *V. unguiculata* sob condições de irrigação e déficit hídrico.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Estratégia Experimental

Esta pesquisa foi estruturada em quatro etapas, desenvolvidas com objetivo de isolar, selecionar e avaliar isolados de DSEs nativos da Caatinga quanto à sua capacidade de colonizar e influenciar a resposta de plantas de *V. unguiculata* ao estresse hídrico.

#### 5.1.1 Etapa 1: Coleta de solo contendo DSEs nativos da Caatinga

Amostras de solo de áreas preservadas de Caatinga, no Semiárido nordestino, foram coletadas na Fazenda Experimental Vale do Curu, UFC, Pentecoste, (IP=721 MM, IA=46,06) (Figura 1), com a finalidade de isolar microrganismos nativos e adaptados àquelas condições de baixa disponibilidade hídrica. Os solos foram coletados próximos às raízes de indivíduos da espécie de Mufumbo (*Combretum lebrosum* Mart.), planta nativa da Caatinga tolerante à seca, em dez pontos amostrais (Tabela 1) distanciados entre si por, no mínimo, 700 m. As amostras foram coletadas a uma profundidade de 15 cm, peneiradas e acondicionadas em sacos plásticos no laboratório de microbiologia de solos (Embrapa), à temperatura ambiente, para posterior utilização.



**Figura 1.** Mapa de localização da área de coleta das amostras de solo da Região semiárida do Brasil no município de Pentecostes, CE. Adaptado de IBAGE (2021).

**Tabela 1.** Coordenadas geográficas dos pontos de coleta de solo na Fazenda Experimental Vale do Curu, pertencente à UFC, localizada no Município de Pentecoste, estado do Ceará.

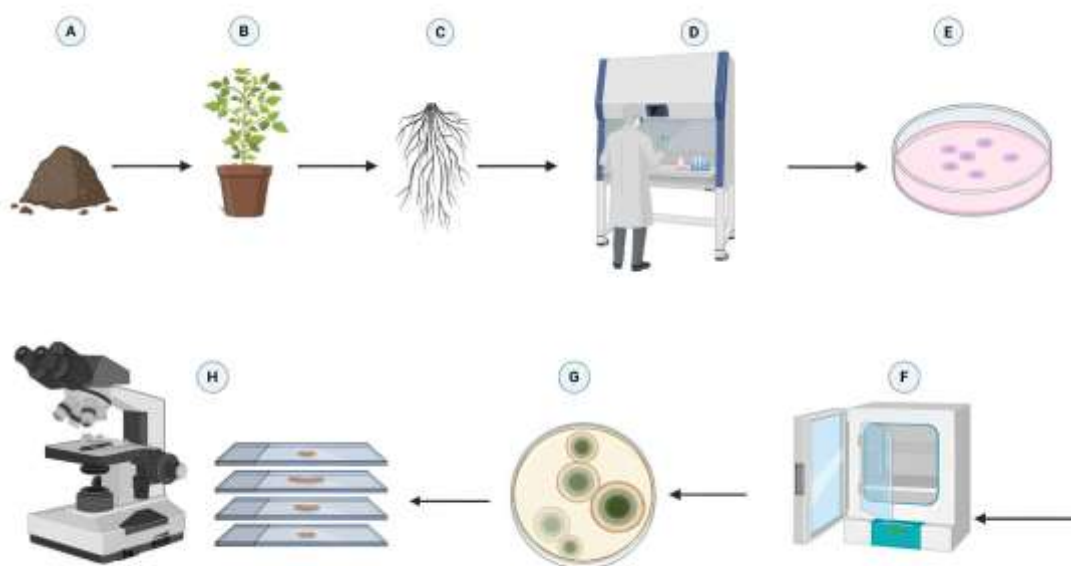
Ponto de coleta	Latitude	Longitude
1	3° 48.2890 'S	39° 19.770 'O
2	3° 48.1390' S	39° 20.3920'O
3	3° 48.8310' S	39° 20.0740'O
4	3° 49.4370' S	39° 20.4590 'O
5	3° 49.1160' S	39° 20.9040'O
6	3° 48.9400' S	39° 20.4940'O
7	3° 48.1780' S	39° 20.8360'O
8	3° 49.0450' S	39° 21.5280'O
9	3° 48.5510' S	39° 21.115667'O
10	3° 48.5620' S	39° 20.4570 'O

### **5.1.2 Etapa 2: Isolamento e seleção de cepas de DSEs**

O isolamento dos fungos DSEs a partir das amostras de solo foi realizado pelo método de cultura-armadilha, utilizando *V. unguiculata*, cultivar BRL Tumucumape, como planta modelo. Para isso, as sementes previamente esterilizadas com hipoclorito de sódio 1% foram semeadas em vasos de 500 mL contendo as dez amostras de solo, sendo cada vaso preenchido com a amostra correspondente a um ponto de coleta. Todos os vasos foram mantidos em capacidade de campo, com irrigação.

Após 40 dias da semeadura, amostras de 1 cm das raízes foram coletadas de todas as plantas e o isolamento dos fungos foi realizado segundo protocolo estabelecido por Bonfim et al. (2016). As amostras de raízes foram desinfetadas superficialmente e distribuídas em placas de Petri, cada uma contendo cinco segmentos de raiz sobre meio ágar com extrato de malte (MEA, do inglês Malt Extract Agar). O MEA utilizado foi preparado com 4g de extrato de malte, 3g de ágar e 150mL de água deionizada. Ainda, foram adicionados 0,5 mL de cloranfenicol e 0,25 mL de estreptomicina para inibir o crescimento de bactérias contaminantes, permitindo apenas o crescimento de fungos no meio. Todas as placas foram incubadas em

B.O.D a 28° C para o facilitar o crescimento das colônias de fungos. Após 7 dias de crescimento dos fungos, foram realizadas repicagens sucessivas apenas das colônias escuras, consideradas como melanizadas. Após isolamento, estas colônias foram estocadas separadamente sob refrigeração, em geladeira. A Figura 2 ilustra esquematicamente todas as etapas dos procedimentos realizados para o isolamento dos fungos DSE.

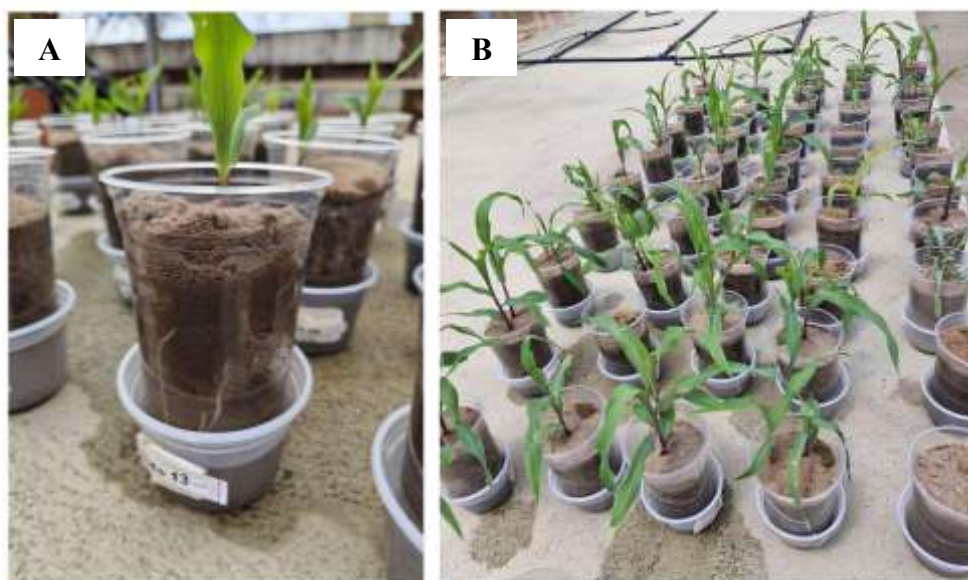


**Figura 2.** Representação esquemática do processo de isolamento dos DSEs. (A) Amostras de solo coletadas de áreas preservadas de Caatinga do Nordeste. (B) Isolamento de fungos utilizando *V. unguiculata* como modelo de captura. (C) Coleta de raízes das plantas de *V. unguiculata*. (D) Desinfestação das raízes. (E) Placas com meio MEA contendo fragmentos de raízes. (F) Incubação das placas em B.O.D a 28 °C. (G) Colônias de fungos desenvolvidas e repicagens sucessivas apenas das colônias escuras, consideradas como melanizadas. (H) Montagem de lâminas para observação das colônias escuras em microscopia de luz para verificação da presença de hifas septadas, microescleródios ou clamidósporos no tecido radicular.

Para confirmar se as colônias de fungos melanizadas isoladas têm potencial de colonizar mais uma cultura, as colônias foram inoculadas em plantas de milho. Neste momento, o milho foi escolhido como planta modelo por se tratar de mais uma planta de interesse agrícola no Semiárido nordestino e devido ao seu sistema radicular mais volumoso, o que facilita a probabilidade de colonização e visualização das hifas. Assim, as sementes foram previamente esterilizadas, semeadas em solo também esterilizado e cada vaso foi inoculado com uma das

cepas de DSE obtidas no isolamento de cultura-armadilha. O inóculo de cada cepa foi preparado em meio líquido, constituído de 20 g de extrato de malte dissolvidos em 1 L de água deionizada autoclavada (Bonfim et al., 2016). O meio foi inoculado com dois discos de meio sólido contendo micélio fúngico e incubado em mesa agitadora a 120 rpm por cinco dias.

As plantas de milho foram cultivadas em casas de vegetação (Figura 3) e os vasos mantidos em capacidade de campo por capilaridade, com água autoclavada. Após 40 dias da semeadura, as amostras de raízes foram coletadas, seccionadas, clarificadas com KOH 5%, sob 80 °C por 1 hora e, em seguida, neutralizadas com ácido acético 6% por 24h em temperatura ambiente. Após esse período, os segmentos foram corados com azul de tripano 0,05% (p/v), montados em lâminas de vidro preservadas com lactoglicerol e observados em microscopia óptica de luz. A colonização fúngica foi avaliada por meio da presença de hifas melanizadas e septadas e de clamidósporos e/ou microescleródios nos segmentos de raízes, conforme descrito previamente na literatura (Farias et al., 2020; Giovannetti, 1980; Bomfim et al. 2016).



**Figura 3.** Plantas de milho (*Zea mays*) durante o experimento para verificação da colonização dos DSEs nativos da Caatinga. (A) Plantas com 13 dias após a semeadura. (B) Plantas com 8 dias após a semeadura.

A porcentagem de colonização foi quantificada segundo Farias (2020), com base na presença/ausência das estruturas características dos DSEs em dez segmentos de raízes. A colonização foi classificada de 0 a 100%, sendo que cada segmento de raiz colonizado equivale a 10%. As cepas que apresentaram os quatro maiores percentuais de colonização foram

selecionadas para as etapas seguintes do estudo, para investigar os efeitos do DSE no crescimento e na tolerância ao estresse hídrico do *V. unguiculata*.

### **5.1.3 Etapa 3: Avaliação da recuperação pós-estresse hídrico em plantas de *V. unguiculata* inoculadas com cepas de DSE**

As quatro cepas que apresentaram maiores taxas de colonização na etapa anterior foram inoculadas, separadamente, em dois genótipos de *V. unguiculata*, contrastantes quanto à tolerância ao estresse hídrico: *Pingo-de-Ouro 1,2 (PO)*, tolerante a seca, e *Santo Inácio (SI)*, sensível a seca (Rodrigues et al., 2017; Basto et al., 2011), com o objetivo de avaliar o efeito da inoculação na recuperação das plantas após o déficit hídrico.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em arranjo fatorial 2 x 3 x 4, constituído por dois genótipos contrastantes quanto à tolerância ao estresse hídrico (PO e SI), três níveis de condição hídrica (irrigação plena, deficiência hídrica moderada e deficiência hídrica severa), e quatro cepas de fungos DSEs (DSE1, DSE2, DSE3, DSE4), com quatro repetições biológicas por tratamento. Após a imposição dos períodos de déficit hídrico, as plantas submetidas aos tratamentos de estresse foram reidratadas e mantidas sob irrigação plena por sete dias, momento no qual foram avaliados a sobrevivência e o crescimento das plantas, bem como a colonização radicular.

As sementes doadas pelo Banco Ativo de Germoplasma (BAG) do Departamento de Fitotecnia da UFC, foram previamente desinfestadas e semeadas em vasos de 2 L, contendo substrato estéril composto por areia e vermiculita (2:1). As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, pertencente ao laboratório de microbiologia do solo da Embrapa Agroindústria Tropical, em Fortaleza-CE (Figura 4). A inoculação fúngica foi realizada no momento do plantio, mediante a adição de 2 mL de cultura fúngica líquida.



**Figura 4:** Plantas de feijão-caupi (*V. unguiculata*) das cultivares Pingo de Ouro 1,2 (PO) e Santo Inácio (SI), inoculadas com as quatro cepas de DSEs, separadamente: DSE1 (F11.5 F1A); DSE2 (F12.3 F2A); DSE3 (F15.3 F1A) e DSE4 (F15.4 F1A), aos 14 dias após a semeadura e sob irrigação plena.

Durante o estabelecimento inicial das plântulas, todos os vasos receberam irrigação com água deionizada e autoclavada e o substrato foi mantido sob 100% da capacidade de campo (CC). A nutrição foi realizada por meio da aplicação semanal de 250 mL de solução nutritiva de Hoagland por vaso, iniciada na segunda semana após o plantio (Hoagland, 1950, Farias et al., 2020).

Após 25 dias do plantio, no estágio V4 (3 folhas trifolioladas completamente expandidas), os tratamentos de déficit hídrico foram iniciados por meio da suspensão da irrigação no solo. Foram estabelecidos três regimes hídricos durante o experimento: (1) irrigação plena (100% da CC); (2) suspensão da irrigação por três dias, caracterizando estresse hídrico moderado (25% da CC); (3) suspensão da irrigação por dez dias, caracterizando estresse hídrico severo (25% da CC). Após os períodos de estresse, as plantas voltaram a ser irrigadas com 100% CC por sete dias para avaliação da recuperação.

Ao final do experimento, a recuperação e o crescimento das plantas sob estresse hídrico foram avaliados com base na taxa de sobrevivência e na biomassa seca da parte aérea e do sistema radicular. A colonização radicular foi avaliada com base na porcentagem de estruturas

características dos DSEs (hifas septadas e melanizadas, microescleródios e clamidósporos), como descrito na etapa anterior. A cepa com maior potencial foi selecionada com base nos resultados de sobrevivência, crescimento e colonização, conjuntamente.

#### **5.1.4 Etapa 4: Respostas fisiológicas e metabólicas de *V. unguiculata* inoculada com DSE sob estresse hídrico**

A cepa de DSE2, previamente selecionada na etapa anterior, foi inoculada no momento do plantio em plantas dos dois genótipos *V. unguiculata* contrastantes quanto à sensibilidade ao estresse hídrico, *PO* e *SI* (Rodrigues et al., 2017; Basto et al., 2011). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em arranjo fatorial 2 x 2 x 2, constituído por dois genótipos (*PO* e *SI*), duas condições hídricas (controle e deficiência hídrica) e dois níveis de inoculação (com DSE e sem DSE), com cinco repetições biológicas por tratamento, totalizando 40 unidades experimentais. O estresse hídrico foi aplicado por dez dias, com irrigação a 25% CC, sendo classificado como severo. O tratamento controle foi mantido 100% da CC. Para quantificar a taxa de colonização foram analisados 10 segmentos de raiz em cada uma das 40 unidades experimentais, totalizando 400 segmentos analisados. Os procedimentos de inoculação, cultivo das plantas em casa de vegetação (Figura 5) seguiram a metodologia descrita no experimento anterior da etapa 3.



**Figura 5.** Plantas de feijão-caupi (*V. unguiculata*) das cultivares Pingo de Ouro 1,2 (*PO*) e Santo Inácio (*SI*), inoculadas com a cepa DSE2, aos 20 dias após a semeadura e sob irrigação plena.

A análise do crescimento foi realizada com base nos parâmetros de comprimento do caule e da raiz e da área foliar, a qual foi estimada pela equação  $AF = \Sigma (=0.6597 (C+L) 2,1745)$ , segundo Sousa Lima et al., (2008).

A tolerância ao estresse hídrico foi avaliada por meio da análise das trocas gasosas e de metabolômica em raízes e folhas. A partir da análise de trocas gasosas nas folhas, foram calculados os seguintes parâmetros: taxa fotossintética líquida (A), condutância estomática (gs), razão entre a concentração intercelular e a concentração atmosférica de CO<sub>2</sub> (Ci/Ca), transpiração (E) e eficiência intrínseca do uso eficiente da água (WUE) (Sharkey et al., 2007). A análise de trocas gasosas foi realizada no início da manhã, utilizando um analisador de gases por infravermelho (GFS-3000, Heinz Walz GmbH, Alemanha). As mesmas folhas utilizadas para as trocas gasosas, bem como as raízes, foram coletadas no período da tarde sendo imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Posteriormente, os metabolitos foram quantificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) (Liu et al., 2022). O material vegetal foi inicialmente macerado, seguido da extração de metabolitos polares mediante a adição de 700 µL de metanol (100%) e 30 µL de ribitol. As amostras foram agitadas em Thermoshaker por 15 min, a 70 °C e 350 rpm. Em seguida os tubos foram centrifugados por 10 min, a 11.000 g, a 27 °C. O sobrenadante foi transferido para tubos de 2 mL, aos quais se adicionaram 375 µL de clorofórmio e 750 µL de água ultrapura gelada. Após nova centrifugação por 15min a 10.000 g, a 4 °C, recolheu-se 150 µL da fase superior (fase polar) transferindo-se para tubos de 1,5 mL. As amostras foram então secas em centrifugador a vácuo por mínimo 10h (overnight). Posteriormente, procedeu-se a derivatização, com adição de 20 µL de pirimidina e 35 µL de MFSTA. Um tubo vazio foi preparado nas mesmas condições, servindo como branco da corrida. A análise dos espectros de massa foi realizada usando o software Xcalibur® 2.1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Os metabolitos foram identificados usando o banco de dados metabolômico de Golm (Kopka et al., 2005).

### ***5.1.5 Análises Estatísticas***

Os dados de crescimento foram submetidos à análise de variância (ANOVA) como explica Rivas et al. (2016). Diferenças significativas foram comparadas pelo teste de variância paramétrica de Tukey com 5% de probabilidade. A taxa de colonização foi estimada segundo modelo Beta (Zuur et al., 2009). As trocas gasosas foram analisadas por meio de variação percentual (Muller et al., 2025). Os dados de metabolômica foram submetidos às análises multivariadas de PCA (principal component analysis) e PLS-DA (partial least square discriminant analysis), utilizando a plataforma Metaboanalyst (Xia & Wishart, 2011).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Isolamento de cepas de DSEs da Caatinga capazes de colonizar *V. unguiculata*

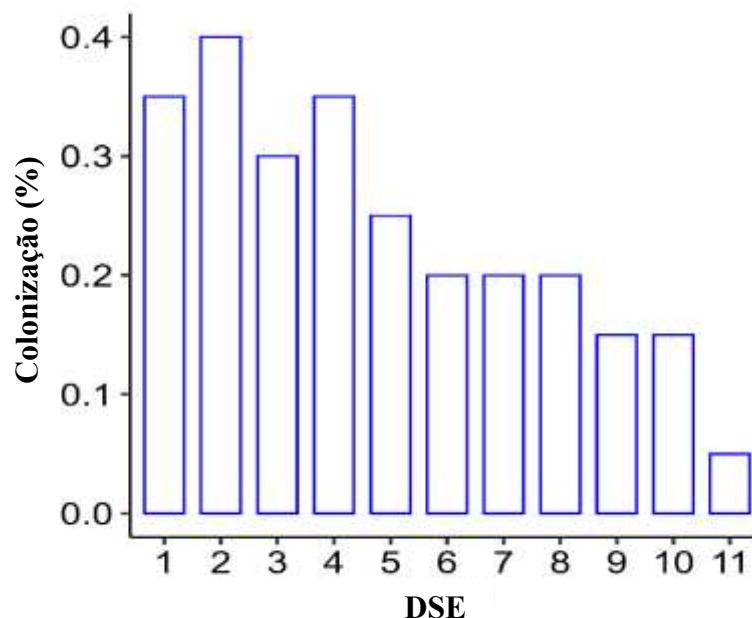
A partir do método de cultura-armadilha, foram obtidos 14 isolados de cepas fúngicas melanizadas das raízes de *V. unguiculata* cultivar BRL Tumucumape, com morfotipos distintos. Todas 14 colônias apresentaram crescimento acelerado, expansão rápida do micélio dentro de 7 dias de incubação. Os isolados foram codificados de acordo com critérios adotados pelo Laboratório de microbiologia de solos da Embrapa (Tabela 2).

**Tabela 2.** Codificação dos isolados de cepas fúngicas de DSEs e descrição dos elementos do código.

DSE	Código do Isolado	Ponto de coleta	nº do isolado
DSE 1	F11.5F1A	1	F1
DSE 2	F12.3F2A	2	F2
DSE 3	F15.3F1A	5	F1
DSE 4	F15.4F1A	5	F1
DSE 5	F12.5F2A	2	F2
DSE 6	F2.3F2A	2	F2
DSE 7	F16.2F1A	6	F1
DSE 8	F16.2F2A	6	F2
DSE 9	F11.3F2A	1	F2
DSE 10	F12.5F1A	2	F1
DSE 11	F12.2F1A	2	F1
DSE 12	F11.4F1A	1	F1
DSE 13	F12.3F1A	2	F1
DSE 14	F16.4F1A	6	F1

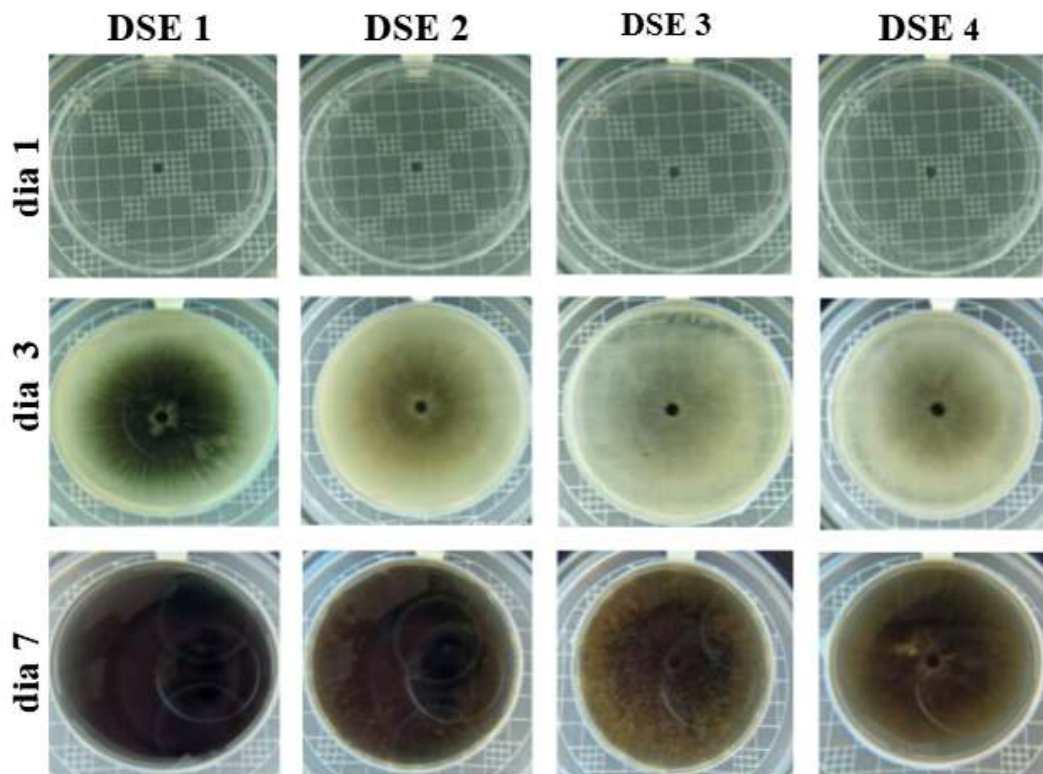
DSE = fungos endofíticos melanizados e septados escuros (DSE); F = planta hospedeira utilizada no método de captura dos isolados (*V. unguiculata*); Ponto de coleta = local de coleta das amostras de solo; Número do isolado = número sequencial do isolado por ponto de coleta;

Das 14 cepas de DSEs isoladas inicialmente das raízes de *V. unguiculata* (cultura-armadilha), 11 apresentaram confirmação endofítica em milho. O percentual de colonização variou de 5% a 40% entre os isolados, indicando diferenças na capacidade de colonização radicular (Figura 6). Dessa forma, as cepas foram numeradas de acordo com os valores de taxa de colonização e as quatro cepas com maior percentual de colonização foram selecionadas para as etapas subsequentes da pesquisa.



**Figura 6**– Taxa de colonização dos isolados de cepas de DSEs nativos da Caatinga em raízes milho (*Zea mays*).

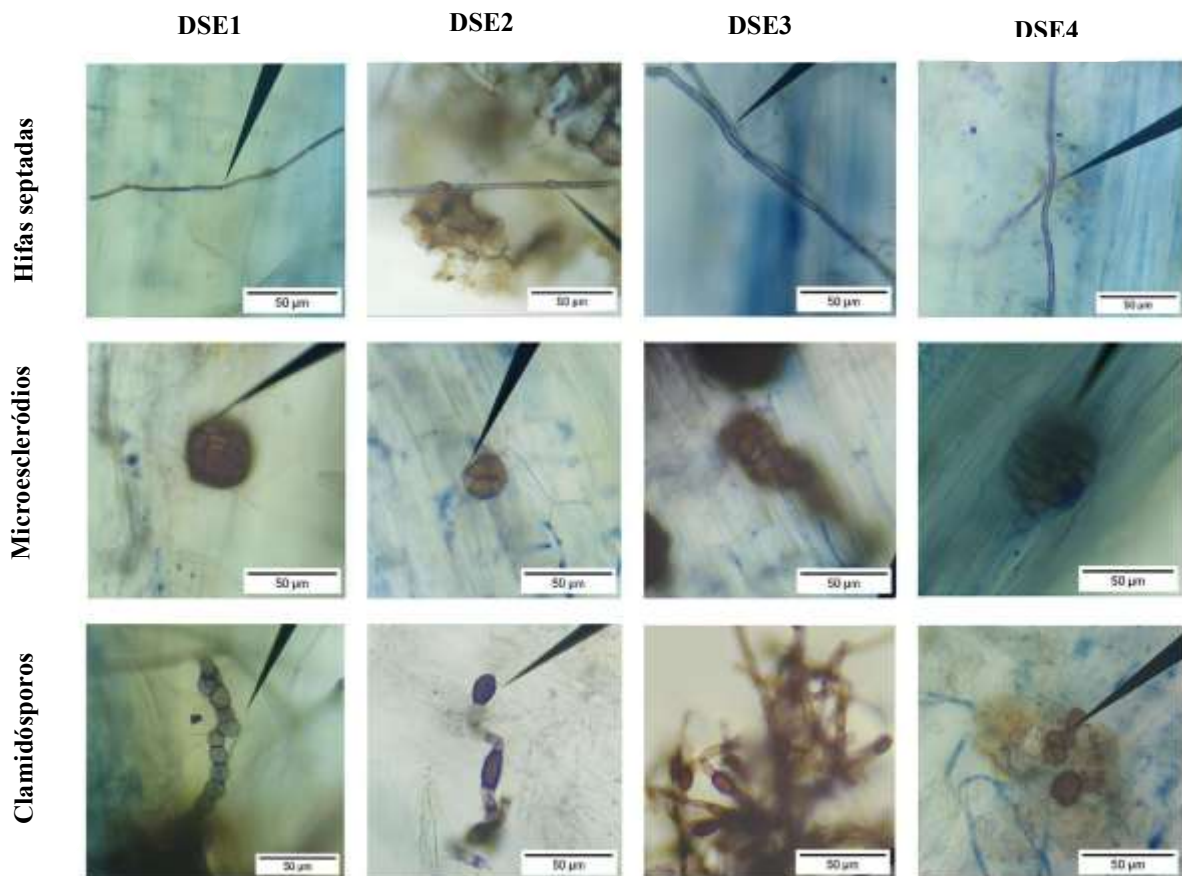
Dentre as quatro cepas selecionadas, a cepa DSE1 apresentou crescimento mais rápido em comparação aos demais isolados. Além disso, a DSE1, apresentou coloração preta mais intensa (possivelmente mais melanizada), característica marcante em relação aos outros isolados. Em termos de velocidade de crescimento, a ordem observada foi: DSE 1 (F11.5 F1A) > DSE 2 (F12.3 F2A) > DSE 4 (F15.4 F1A) > DSE 3 (F15.3 F1A) (Figura 7).



**Figura 7.** Crescimento das quatro cepas de DSEs selecionados, em placa com meio MEA ao longo de sete dias. DSE1 (F11.5 F1A); DSE2 (F12.3 F2A); DSE3 (F15.3 F1A) e DSE4 (F15.4 F1A).

### 6.2 Efeito da inoculação com quatro cepas de DSE na recuperação pós-estresse hídrico em *V. unguiculata*

A colonização fúngica das plantas de *V. unguiculata* com as quatro cepas de DSE selecionadas foi confirmada por meio da observação de segmentos de raiz em microscópio óptico de luz. A análise das raízes das plantas pós-estresse moderado (RMD; *recuperação pós estresse moderado*) e severo (RSD; *recuperação após estresse severo*) revelou a presença de estruturas típicas dos DSEs, como hifas septadas escuras ou marrons, microescleródios e clamidósporos (Figura 8).



**Figura 8.** Estruturas morfológicas das quatro cepas de DSEs1 (F11.5 F1A); DSE2 (F12.3 F2A); DSE3 (F15.3 F1A) e DSE4 (F15.4 F1A) observadas nas raízes das duas cultivares contrastantes de *V. unguiculata* Pingo de Ouro 1,2 (PO) e Santo Inácio (SI).

Após a recuperação do estresse moderado e severo, a taxa de colonização não sofreu efeito significativo das cepas de DSE e do genótipo, tampouco houve interação entre esses fatores (Tabela 3). No entanto, a taxa de colonização foi significativamente afetada pelo regime hídrico ( $p = 0.014$ ), enquanto não foram observados efeitos do genótipo ( $p = 0.35$ ) nem da interação entre genótipo e regime hídrico ( $p = 0.50$ ).

**Tabela 3.** Estimativas dos parâmetros do modelo Beta para a taxa de colonização de plantas de dois genótipos de *V. unguiculata* colonizadas com quatro cepas de DSE, sob dois regimes hídricos (estresse moderado e severo).

Fatores	Estimativa	Erro	F valor	Pr (>F)
Interceptação	- 1.77	3.79	-4.68	2.87e-06***
Genótipo	4.07	4.39	0.93	0.35
Condição hídrica	1.032	4.21	2.44	1.44e-02*
Condição hídrica :genótipo	-4.92	7.3	-0.67	0.50

Foram avaliados os efeitos individuais de genótipos, condição hídrica e cepa de DSE, bem como suas interações sobre o número de microescleródios. estimativa =valor estimado do parâmetro, std. erro = erro padrão, F valor = estatística F, p valor= valor de p. Asteriscos de indicam diferenças estatísticas significativas ( $p \leq 0,05^*$ ,  $p \leq 0,01^{**}$ ,  $p \leq 0,001^{***}$ ).

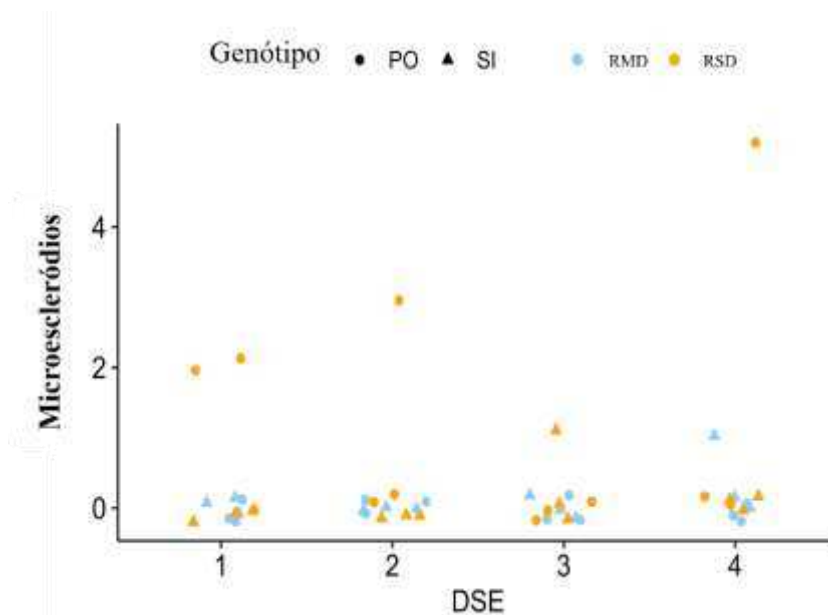
O número de microescleródios nas raízes foi significativamente influenciado pelo genótipo da planta, pelas condições hídricas e pela interação entre genótipo e condições hídricas. No entanto, não foi observado nenhum efeito significativo das diferentes cepas de DSE para essa variável (Tabela 4).

**Tabela 4.** Resultado da análise de variância para o número de microescleródios presentes nas raízes de plantas de *V. unguiculata* inoculadas com cepas de DSEs, ajustadas pelo modelo linear generalizado (GLM) com distribuição Poisson.

Fatores	Df	Dev	df. Residual	residual. Dev	Pr (>F)
NULL				47	62.73
Genótipo	1.0	7.92	42	38.50	4.88e-03***
Condição hídrica	1.0	12.20	43	46.42	4.77e-04***
DSE	3.0	4.11	44	58.63	2.50e-01
Condição hídrica: DSE	3.0	1.80	39	36.70	6.15e-01
Genótipo: DSE	3.0	6.08	36	30.62	1.08e-01
Genótipo: Condição hídrica	1.0	5.41	35	25.22	2.01e-02*
Genótipo: Condição hídrica :DSE	3.0	0.00	32	25.22	1.00e+00

Foram avaliados os efeitos individuais de genótipos, condição hídrica e cepa de DSE, bem como suas interações sobre o número de microescleródios. df = graus de liberdade; Sum Sq = soma dos quadrados; Mean Sq = quadrado médio; F = estatística F e Pr = valor de p. Asteriscos de indicam diferenças estatísticas significativas ( $p \leq 0,05^*$ ,  $p \leq 0,01^{**}$ ,  $p \leq 0,001^{***}$ ).

Sob estresse moderado, o genótipo SI apresentou, em média, uma (1,0) estrutura, enquanto a cultivar PO não apresentou formação de estruturas de microescleródios. No entanto, sob estresse severo, a cultivar PO apresentou média de 3,0 estruturas, enquanto SI apresentou em média, uma (1,0) estrutura, resultando em diferença absoluta de 2,0 estruturas entre as cultivares. Em termos relativos, PO apresentou valor aproximadamente três vezes maior que SI sob estresse severo (aumento de cerca de 200%). O cálculo das medias foi feito somando todas as observações e dividindo pelo número de repetições (Figura 9).



**Figura 9.** Número de microscleródios de quatro cepas de DSE DSE1 (F11.5 F1A), DSE2 (F12.3 F2A), DSE3 (F15.3 F1A) e DSE4 (F15.4 F1A), inoculadas nas cultivares Pingo-de-Ouro-1,2 (PO) e Santo Inácio (SI) de *V. unguiculata*, cultivadas sob condições de estresse hídrico moderado (RMD) e estresse hídrico severo (RSD). Os dados representam um espaço amostral composto por repetições independentes (n=3).

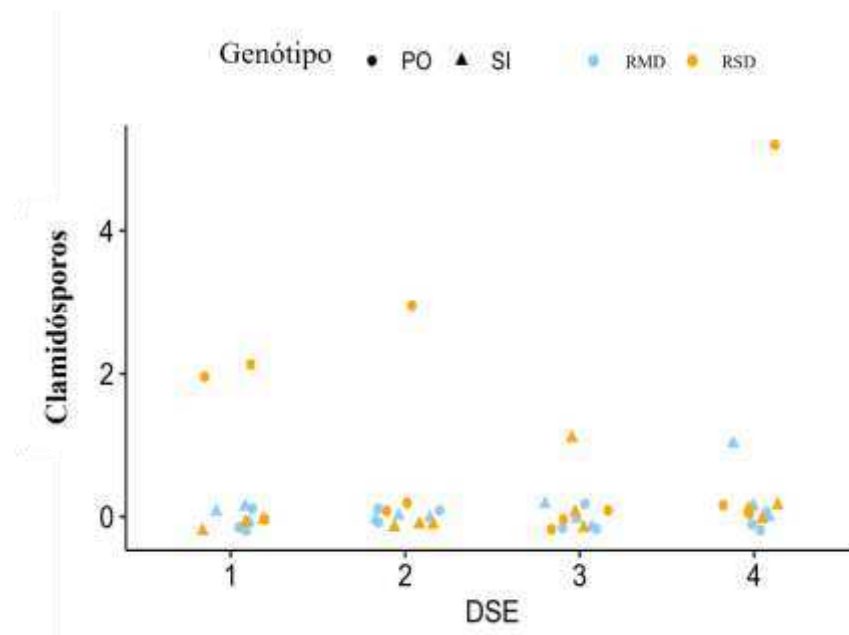
A presença de clamidósporos nas raízes foi influenciada pela cepa de DSE e pela interação genótipo x condição hídrica (Tabela 5).

**Tabela 5.** Resultado da análise de variância para o número de clamidósporos presentes nas raízes de plantas de *V. unguiculata* inoculadas com cepas de DSEs, ajustadas pelo modelo linear generalizado (GLM) com distribuição de Poisson.

Fatores	Df	Dev	df. Residual	residual. Dev	Pr (>F)
NULL				47	40.74
Genótipo	1.0	1.65	42	28.53	2.00e-01
Condição hídrica	1.0	1.65	43	30.17	2.00e-01
DSE	3.0	8.92	44	31.82	3.04e-02*
Condição hídrica: DSE	3.0	2.66	39	25.87	4.48e-01
Genótipo: DSE	3.0	2.66	36	23.22	4.48e-01
Genótipo: Condição hídrica	1.0	5.06	35	18.15	2.45e-02*
Genótipo: Condição hídrica: DSE	3.0	0.00	32	18.15	1.00e+00

Foram avaliados os efeitos individuais de genótipos, condição hídrica e cepa de DSE, bem como suas interações sobre o número de clamidósporos. df = graus de liberdade; Sum Sq = soma dos quadrados; Mean Sq = quadrado médio; F = estatística F e Pr = valor de p. Asteriscos de indicam diferenças estatísticas significativas ( $p \leq 0,05^*$ ,  $p \leq 0,01^{**}$ ,  $p \leq 0,001^{***}$ ).

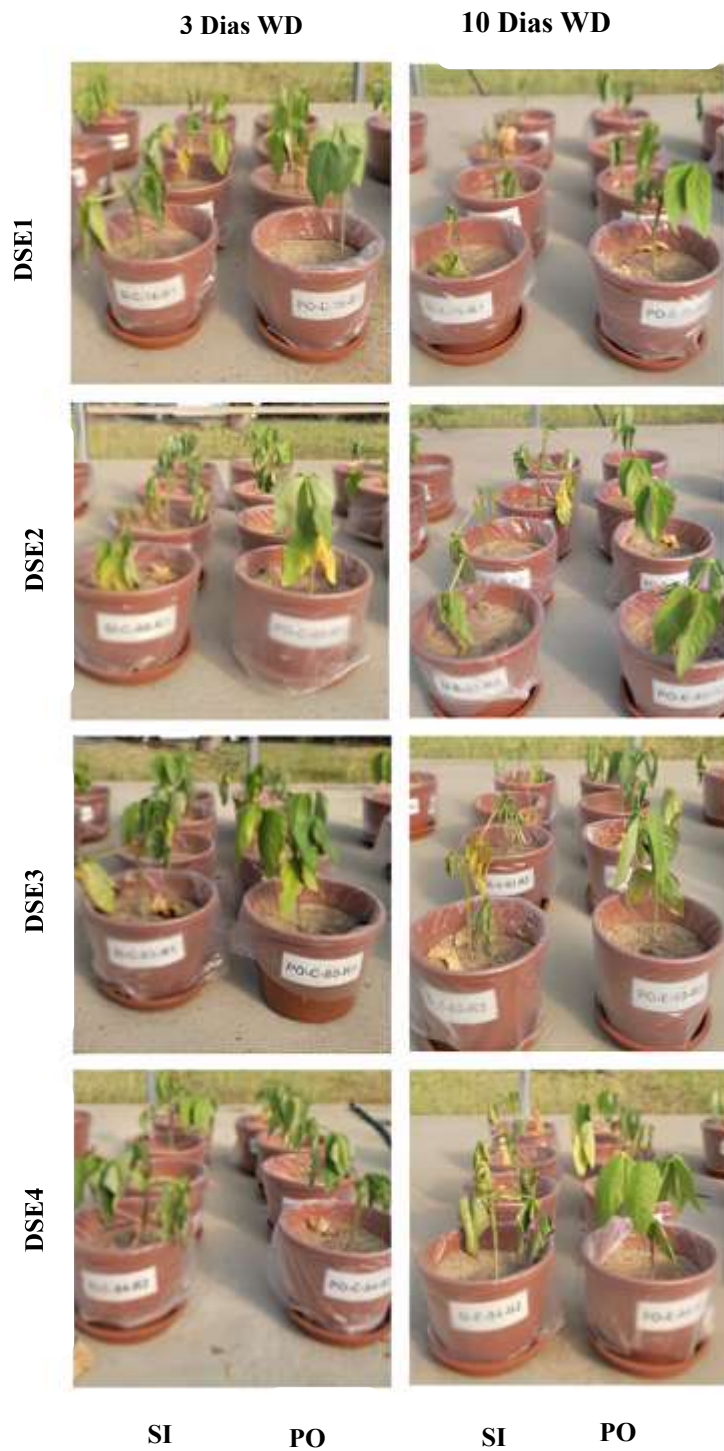
A média do número das estruturas de clamidósporos da cepa DSE1 foi 1,75, enquanto as cepas DSE2, DSE3 e DSE4 apresentaram em média, uma (1,0) estrutura de clamidósporo. Assim, a cepa 1 apresentou diferença absoluta de 0,75 de número de estruturas de clamidósporos em relação as demais cepas, correspondendo a um aumento de aproximadamente 75%. Não houve diferença entre as condições hídricas. A cultivar PO apresentou média de 3,0 estruturas de clamidósporos, a cultivar SI apresentou média de 1,17 resultando em diferença de 1,83, correspondendo a aumento de aproximadamente 156% na cultivar PO em relação a SI. O cálculo das medias foi feito somando todas as observações e dividindo pelo número de repetições (Figura 10).



**Figura 10.** Número de clamidósporos de quatro cepas de DSE DSE1 (F11.5 F1A), DSE2 (F12.3 F2A), DSE3 (F15.3 F1A) e DSE4 (F15.4 F1A), inoculadas nas cultivares Pingo-de-Ouro-1,2 (PO) e Santo Inácio (SI) de *V. unguiculata*, cultivadas sob condições de estresse hídrico moderado (RMD) e estresse hídrico severo (RSD). Os dados representam um espaço amostral composto por repetições independentes (n=3).

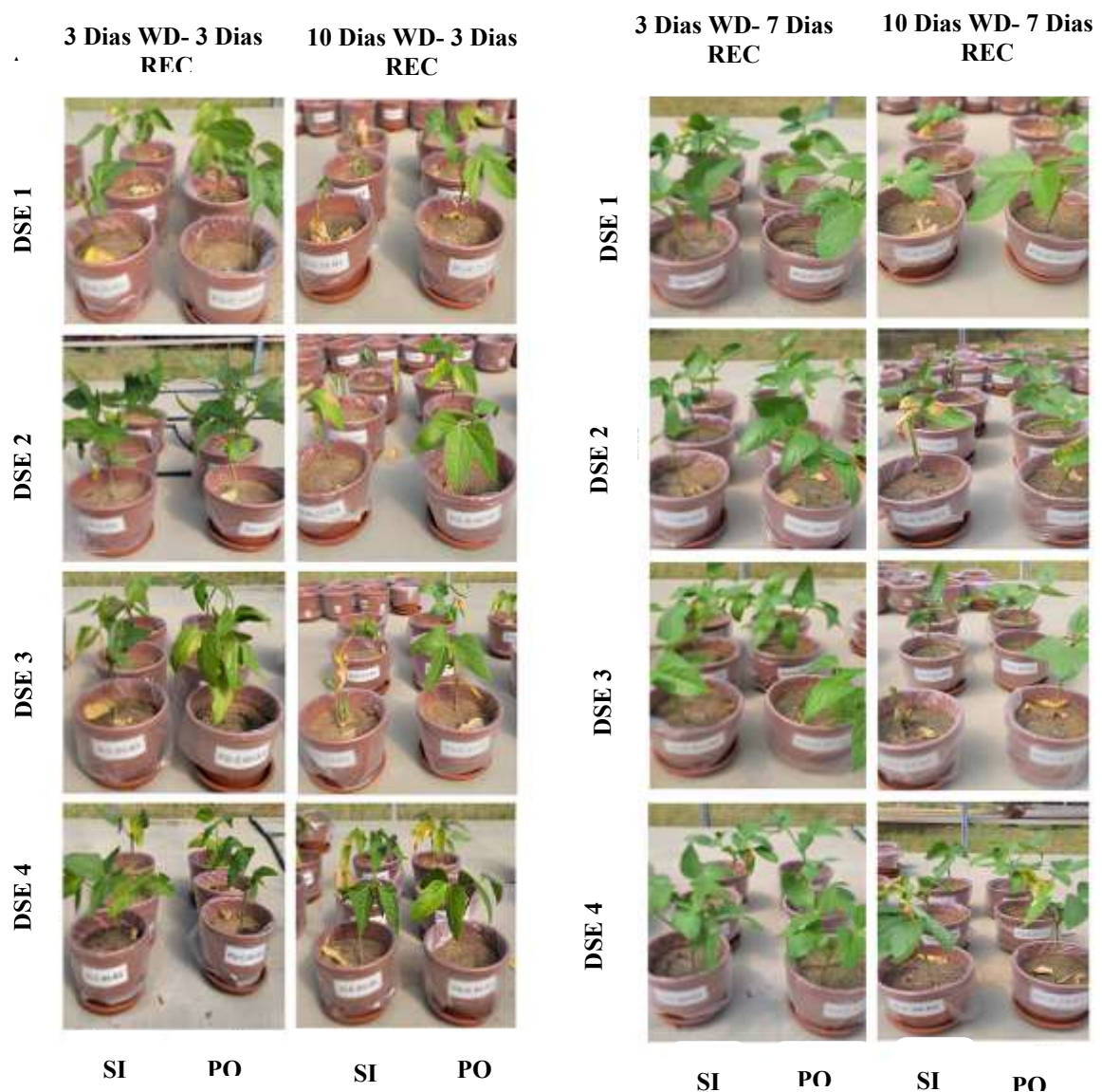
Todas as plantas submetidas ao estresse hídrico moderado e ao estresse hídrico severo apresentaram sintomas visuais característicos de deficiência hídrica, incluindo folhas murchas posicionadas para baixo e clorose, sendo observada maior queda foliar no estresse hídrico severo. No que concerne aos DSEs, plantas da cultivar PO inoculadas com DSE2 e DSE4 apresentaram menor queda de folhas e menor intensidade dos sintomas de clorose, indicando menor impacto do déficit hídrico em comparação com as plantas inoculadas com as demais cepas (Figura 11).

Das 64 unidades experimentais inicialmente estabelecidas (16 tratamentos x 4 repetições), uma repetição foi perdida em cada tratamento, totalizando 48 unidades sobreviventes, correspondente a aproximadamente 75% de sobrevivência.



**Figura 11.** Plantas de *V. unguiculata* das cultivares Pingo-de-Ouro-1,2 (PO) e santo Inácio (SI) submetidas a suspensão de irrigação por 3 e 10 dias.

Após 7 dias de irrigação, a recuperação das plantas foi notória a partir do terceiro dia para todas as cultivares. As plantas recuperadas no sétimo dia diferiram das do terceiro dia por apresentarem visivelmente maior emissão de folhas, com aspecto de maior turgescência e cor esverdeada, indicando maior acúmulo da clorofila e redução da clorose. As plantas recuperadas no terceiro dia ainda apresentavam danos remanescentes do déficit hídrico, evidenciando sintomas como clorose, redução da turgescência e folhas curvadas para baixo. As plantas inoculadas com o DSE1 e DSE3, apresentaram visualmente recuperação mais lenta caracterizada por menor número de desenvolvimento de folhas em comparação às plantas inoculadas com DSE2 e DSE4 para ambos períodos de recuperação (Figura 12).



**Figura 12.** Plantas de *V. unguiculata* das cultivares Pingo-de-Ouro-1,2 (PO) e santo Inácio (SI) após serem submetidas ao déficit hídrico por 3 e 10 dias, seguidos de um período de recuperação de 3 dias (A) e 7 dias (B).

O efeito da inoculação dos DSEs sobre o crescimento dos genótipos contrastantes de *V. unguiculata* foi avaliado por meio da biomassa seca das raízes e da parte aérea, após recuperação do estresse hídrico moderado e severo. Não houve diferença significativa na biomassa da raiz entre genótipos e condições hídrica, tão pouco houve interação significativa entre esses fatores. No entanto, houve diferenças significativas na biomassa da raiz para o fator DSE (Tabela 6).

**Tabela 6.** Resultado de análise de variância (ANOVA) da biomassa da raiz de plantas de *V. unguiculata* colonizadas com quatro cepas de DSEs diferentes.

Fatores	Df	Sum Sq	Mean Sq	F valor	Pr (>F)
Genótipo	1.0	0.04	0.04	0.31	5.84e-01
Condição hídrica	1.0	0.51	0.51	3.90	5.69e-02
DSE	3.0	2.37	0.79	6.08	2.14e-03**
Condição hídrica: DSE	3.0	0.63	0.21	1.61	2.07e-01
Genótipo: DSE	3.0	1.03	0.34	2.65	6.55e-02
Genótipo: Condição hídrica	1.0	0.05	0.05	0.36	5.50e-01
Genótipo: Condição hídrica: DSE	3.0	0.0	0.02	0.15	9.28e-01
Resíduos	32.0	4.16	0.13		

Foram avaliados os efeitos individuais de genótipos, condição hídrica e cepa de DSE, bem como suas interações sobre biomassa da raiz. df = graus de liberdade; Sum Sq = soma dos quadrados; Mean Sq = quadrado médio; F = estatística F e Pr = valor de p. Asteriscos de indicam diferenças estatísticas significativas ( $p \leq 0,05^*$ ,  $p \leq 0,01^{**}$ ,  $p \leq 0,001^{***}$ ).

O teste de Tukey indicou que a cepa de DSE1 e DSE3 não diferiram significativamente entre si ( $p > 0,05$ ). Em contrapartida, houve diferença entre DSE4 e DSE2. A cepa DSE4 promoveu um aumento de aproximadamente 71,3% da biomassa seca da raiz em comparação com a cepa DSE2 (Tabela 7), sugerindo um efeito positivo da inoculação sobre o crescimento da raiz.

**Tabela 7.** Biomassa seca da raiz de plantas de *V. unguiculata* inoculadas com cepas de DSE

DSEs	Biomassa raiz
DSE1	0.68 ± 0.33 ab
DSE2	0.65 ± 0.17 b
DSE3	0.87 ± 0.41 ab
DSE4	1.10 ± 0.34 a

Letras diferentes na coluna indicam diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey a 0,05% de significância.

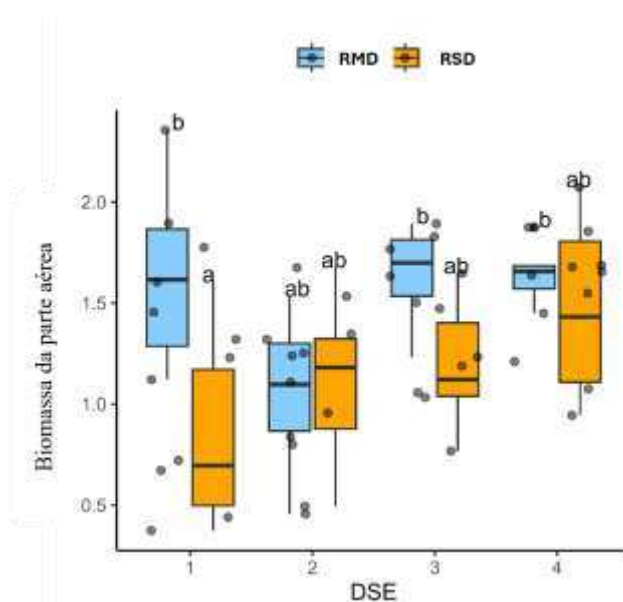
A biomassa da parte aérea foi influenciada pelos fatores isolados genótipo, condição hídrica, DSE, bem como pela interação condição hídrica e DSE (Tabela 8).

**Tabela 8.** Resultado de análise de variância (ANOVA) da biomassa da parte aérea de plantas de *V. unguiculata* colonizadas com quatro cepas de DSEs diferentes.

Fatores	Df	Sum Sq	Mean Sq	F valor	Pr (>F)
Genótipo	1.0	1.18	0.18	3.89	5.06e-03**
Condição hídrica	1.0	1.37	1.37	10.57	2.71e-03**
DSE	3.0	1.52	0.51	3.89	1.78e-02*
Condição hídrica: DSE	3.0	1.18	0.39	3.02	4.42e-02*
Genótipo: DSE	3.0	0.18	0.06	0.46	7.12e-01
Genótipo: Condição hídrica	1.0	0.32	0.32	2.46	1.27e-01
Genótipo: Condição hídrica: DSE	3.0	0.04	0.01	0.11	9.56e-01
Resíduos	32.0	4.16	0.13		

Foram avaliados os efeitos individuais de genótipos, condição hídrica e cepa de DSE, bem como suas interações sobre a biomassa da parte aérea. df = graus de liberdade; Sum Sq = soma dos quadrados; Mean Sq = quadrado médio; F = estatística F e Pr = valor de p. Asteriscos de indicam diferenças estatísticas significativas ( $p \leq 0,05^*$ ,  $p \leq 0,01^{**}$ ,  $p \leq 0,001^{***}$ ).

As plantas inoculadas com o DSE1 apresentaram redução de aproximadamente 57,4% da biomassa da parte aérea após recuperação do estresse severo, em comparação ao estresse moderado. Já as plantas inoculadas com as cepas DSE2, DSE 3 e DSE4 não apresentaram diferença na produção de biomassa da parte aérea após recuperação de diferentes níveis de estresse hídrico. No entanto, a cepa DSE2 e DSE4 reduziram o impacto do estresse severo sobre o crescimento e promoveram a manutenção do crescimento a níveis semelhantes ao do estresse moderado. As plantas inoculadas com a cepa DSE3 apresentaram maior crescimento pós-estresse moderado comparado ao pós-estresse severo (Figura 13).



**Figura 13.** Biomassa da parte aérea das plantas inoculadas com quatro cepas de DSE diferentes, DSE1 (F11.5 F1A), DSE2 (F12.3 F2A), DSE3 (F15.3 F1A) e DSE4 (F15.4 F1A), sob condições de estresse hídrico moderado (RMD) e sob estresse hídrico severo (RSD). Os dados representam um espaço amostral composto por repetições independentes (n=3). As hastes (bigodes) indicam os valores máximos e mínimos observados. A caixa representa o intervalo interquartil (Q1-Q3) e a linha horizontal no interior da caixa corresponde à mediana. Os pontos representados fora das hastes, em coloração preta mais intensa, correspondem aos outliers, indicando valores individuais fora da distribuição esperada dos dados. Os pontos localizados entre a caixa e os bigodes representam valores normais, correspondentes às repetições amostrais. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa, de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), aplicado a comparação das médias (n=3).

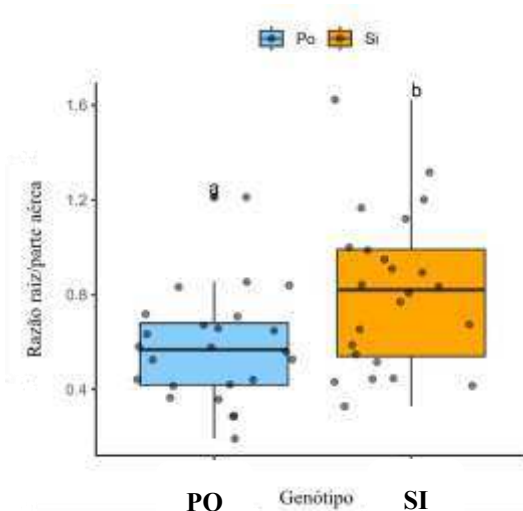
A razão R/PA foi influenciada exclusivamente pelo fator genótipo (Tabela 9).

**Tabela 9.** Resultados da análise de variância (ANOVA) da razão raiz/parte aérea de plantas de *V. unguiculata* colonizadas com quatro cepas de DSEs diferentes.

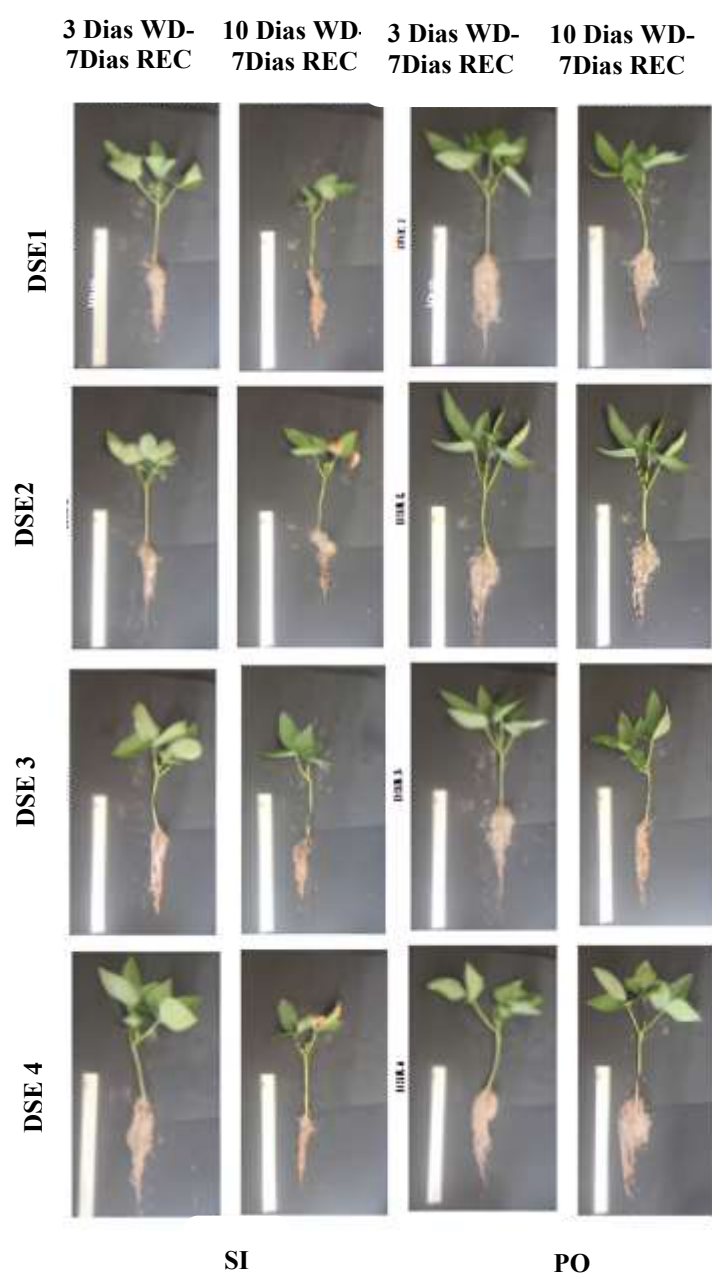
Fatores	Df	Sum Sq	Mean Sq	F valor	Pr (>F)
Genótipo	1.0	0.68	0.68	8.22	7.27e-03**
Condição hídrica	1.0	0.01	0.01	0.17	6.79e-01
DSE	3.0	0.55	0.18	2.21	1.06e-01
Condição hídrica: DSE	3.0	0.04	0.01	0.17	9.16e-01
Genótipo: DSE	3.0	0.20	0.07	0.79	5.07e-01
Genótipo: Condição hídrica	1.0	0.05	0.05	0.61	4.40e-01
Genótipo: Condição hídrica: DSE	3.0	0.12	0.04	0.49	6.93e-01
Resíduos	32.0	2.65	0.08		

Foram avaliados os efeitos individuais de genótipos, condição hídrica e cepa de DSE, bem como suas interações sobre a razão raiz/parte aérea. df = graus de liberdade; Sum Sq = soma dos quadrados; Mean Sq = quadrado médio; F = estatística F e Pr = valor de p. Asteriscos de indicam diferenças estatísticas significativas ( $p \leq 0,05^*$ ,  $p \leq 0,01^{**}$ ,  $p \leq 0,001^{***}$ ).

A cultivar SI apresentou maior razão R/PA, com um valor médio de aproximadamente 37,2% maior, em comparação à razão R/PA apresentada pelas plantas da cultivar PO, independente do regime hídrico da cepa de DSE inoculada, evidenciando maior investimento do crescimento em raízes pelo genótipo mais sensível ao estresse hídrico (Figura 14)



**Figura 14.** Razão biomassa seca da raiz/parte aérea (R/PA) de dois genótipos de *V. unguiculata*, inoculadas com quatro diferentes cepas de DSE: DSE1 (F11.5 F1A), DSE2 (F12.3 F2A), DSE 3 (F15.3 F1A) e DSE4, após recuperação do estresse hídrico medrado e estresse hídrico severo. Os dados representam um espaço amostral composto por repetições independentes (n=3). As hastes (bigodes) indicam os valores máximos e mínimos observados. A caixa representa o intervalo interquartil (Q1-Q3) e a linha horizontal no interior da caixa corresponde à mediana. Os pontos representados fora das hastes, em coloração preta mais intensa, correspondem aos outliers, indicando valores individuais fora da distribuição esperada dos dados. Os pontos localizados entre a caixa e os bigodes representam valores normais, correspondentes às repetições amostrais. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa, de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), aplicado a comparação das médias (n=3).



**Figura 15.** Parte aérea e radicular de plantas de *V. unguiculata* das cultivares Pingo-de-Ouro-1,2 (PO) e Santo Inácio (SI) após recuperação de sete dias do estresse hídrico moderado e severo.

Para a seleção das cepas, considerou-se o desempenho sob ambas condições de estresse hídrico, mesmo na ausência de diferenças estatísticas significativas. As plantas inoculadas com a cepa DSE2 e a cepa DSE4 apresentaram menores sintomas visuais de estresse e mantiveram biomassa da parte aérea semelhante pós-estresse a recuperação do estresse hídrico moderado e severo. Em particular, a cepa 2 destacou-se por manter a produção da biomassa consistente sob os dois níveis de estresse, indicando potencial para atenuar os efeitos do déficit hídrico (Figura 13). E também apresentou menor dispersão dos em torno da média (Tabela 7). Com base nesses resultados, a cepa 2 foi selecionada para a etapa posterior do estudo, visando investigar de forma mais detalhada da sua capacidade modular respostas fisiológicas e promover resiliência hídrica em *V. unguiculata*.

### 6.3 Efeito do estresse hídrico na colonização radicular, no crescimento e nas trocas gasosas de *V. unguiculata* inoculada com a cepa DSE2 (F12.3F2A).

A análise do modelo Beta indicou que a taxa de colonização radicular das plantas de *V. unguiculata* inoculadas com a cepa DSE2 foi significativamente influenciada pelo genótipo e pelo regime hídrico, com interação entre esses fatores (Tabela 10).

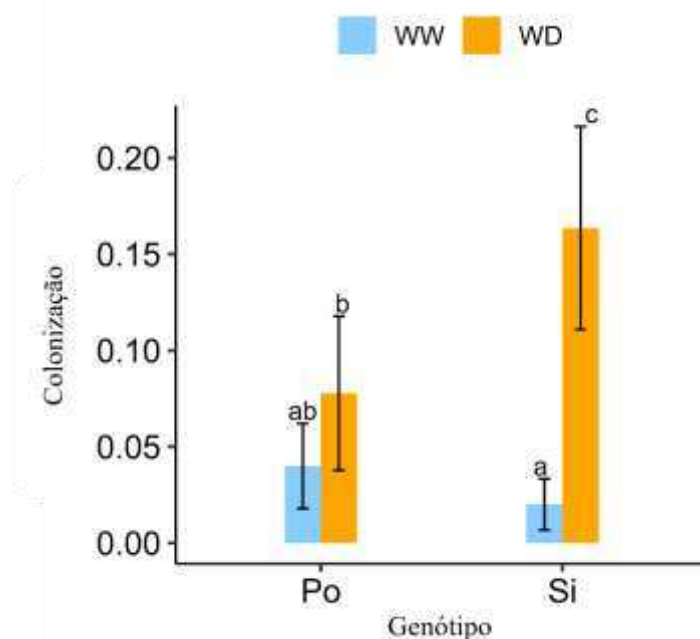
**Tabela 10.** Estimativas dos parâmetros do modelo Beta para a taxa de colonização de plantas de dois genótipos de *V. unguiculata* colonizadas com cepa de DSE2, sob dois regimes hídricos.

Fatores	Estimativa	std. erro	F valor	p valor
Intercepto	-1.08	0.28	-3.90	39.47e-05***
Condição hídrica	0.32	0.13	2.56	1.04e-02*
Genótipo	-0.12	0.12	-0.93	3.50e-01
Condição hídrica:	0.60	0.19	3.09	2.00e-

Fatores	Estimativa	std. erro	F valor	p valor
Genótipo				03**
	329.60	287.29	1.15	2.51e-01
	1.24	0.62	2.00	4.53e-02*

Foram avaliados os efeitos do genótipo, condição hídrica e sua interação. estimativa = valor estimado do parâmetro, std. erro = erro padrão, F valor = estatística F, p valor = valor de p. Asteriscos de indicam diferenças estatísticas significativas ( $p \leq 0,05^*$ ,  $p \leq 0,01^{**}$ ,  $p \leq 0,001^{***}$ ).

A taxa de colonização na cultivar PO não diferiu significativamente entre os tratamentos de condições hídricas (WW e WD). Em contraste na cultivar SI, a colonização média sob estresse hídrico severo (WD) foi de 0,34, enquanto sob condição irrigada (WW) foi de 0,04. A partir do cálculo da proporção, observa-se que a condição WD foi aproximadamente 8,5 vezes maior em relação a condição WW. E entre as cultivares, a SI apresentou uma média de 0.19, enquanto a cultivar PO apresentou uma média de 0,12. Observa-se que a colonização da cultivar SI foi aproximadamente 1,6 vezes maior em relação a PO (Figura 16).



**Figura 16.** Taxa de colonização nas raízes das plantas de *V. unguiculata* das cultivares Pingo-de-Ouro-1,2 (PO) e Santo Inácio (SI), cultivadas em vasos sob condições de irrigação plena de

100% CC (WW) e sob déficit hídrico 25% CC (WD). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão, de cinco repetições ( $n = 5$ ). Tratamentos que compartilham pelo menos uma letra, não diferem estatisticamente, enquanto aqueles que não compartilham nenhuma letra apresentam diferença significativa.

Ao final do período experimental, as plantas do tratamento de irrigação plena apresentaram desenvolvimento adequado, folhas túrgidas e completamente expandidas, independente da inoculação com a cepa de DSE. Em contraste, as plantas submetidas a déficit hídrico moderado apresentaram folhas murchas e curvadas para baixo. Essa condição foi mais pronunciada na cultivar SI comparado a cultivar PO (Figura 17).

### Santo Inácio (SI)



### Pingo de Ouro 1,2 (PO)



**Figura 17.** Plantas da cultivar Santo Inácio (SI) e Pingo de Ouro 1,2 (PO). Plantas controle, cultivadas sob irrigação a 100% da CC, sem inoculação com DSE2 (A). Plantas controle a 100% da CC, inoculadas com o DSE2 (B). Plantas sob déficit hídrico a 25% da CC, sem inoculação com DSE2 (C). Plantas sob déficit hídrico a 25% da CC, inoculadas com a cepa DSE2 (D). Imagens capturadas aos nove dias após a interrupção da irrigação.

Após dez dias de imposição do tratamento do déficit hídrico, as plantas foram removidas do substrato, para a medição do comprimento do caule e da raiz. Nenhum dos fatores avaliados apresentou efeito significativo sobre o comprimento da raiz (Tabela 11).

**Tabela 11.** Resultado da análise de variância (ANOVA) do comprimento da raiz de plantas de duas cultivares de *V. unguiculata*, com tratamentos de fungo, colonizadas com cepa de DSE2 e não colonizadas e dois regimes hídricos, 100% CC e 25% CC.

Fatores	Df	Sum Sq	Mean Sq	F valor	Pr (>F)
Genótipo	1.0	93.43	93.43	2.23	1.45e-01
Condição hídrica	1.0	90.99	90.99	2.17	1.50e-01
DSE	1.0	2.81	2.81	0.07	7.97e-01
Condição hídrica: DSE	1.0	65.97	65.97	1.58	2.19e-01
Genótipo: DSE	1.0	0.84	0.84	0.02	8.89e-01
Genótipo: Condição hídrica	1.0	16.18	16.18	0.39	5.39e-01
Genótipo: Condição hídrica: DSE	1.0	165.10	165.10	3.94	5.59e-02
Resíduos	31.0	1,297.54	41.86		

Foram avaliados os efeitos individuais de genótipos, condição hídrica e cepa de DSE, bem como suas interações. df = graus de liberdade; Sum Sq = soma dos quadrados; Mean Sq = quadrado médio; F = estatística F e Pr = valor de p. Asteriscos de indicam diferenças estatísticas significativas ( $p \leq 0,05^*$ ,  $p \leq 0,01^{**}$ ,  $p \leq 0,001^{***}$ ).

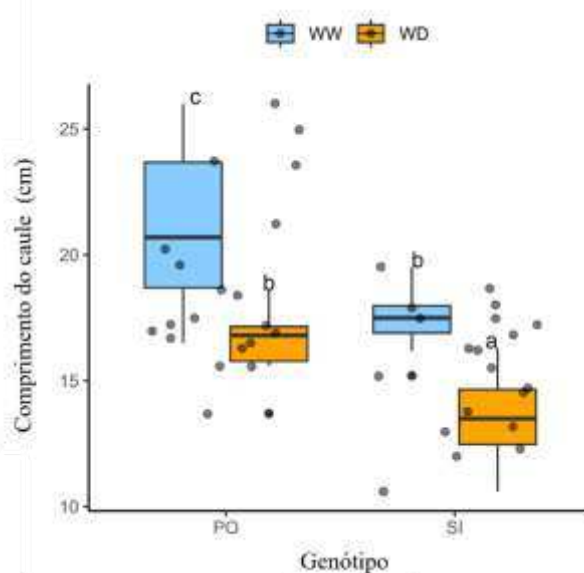
O comprimento do caule foi significativamente influenciado pelos fatores genótipo e condição hídrica, isoladamente (Tabela 12). A inoculação do DSE não teve efeito sobre o comprimento do caule.

**Tabela 12.** Resultado da análise de variância (ANOVA) do comprimento do caule, de plantas de *V. unguiculata* colonizadas com cepa de DSEs2.

Fatores	Df	Sum Sq	Mean Sq	F valor	Pr (>F)
Genótipo	1.0	109.23	109.23	23.89	2.76e-05***
Condição hídrica	1.0	180.20	180.20	39.41	4.87e-07***
DSE	1.0	6.81	6.81	1.49	2.31e-01
Condição hídrica: DSE	1.0	0.70	0.70	1.15	6.98e-01
Genótipo: DSE	1.0	0.65	0.65	0.14	7.09e-01
Genótipo: Condição hídrica	1.0	1.48	1.48	0.32	5.73e-01
Genótipo: Condição hídrica: DSE	1.0	0.42	0.42	0.09	7.64e-01
Resíduos	32.0	146.33	4.57		

Foram avaliados os efeitos individuais de genótipos, condição hídrica e cepa de DSE, bem como suas interações sobre o comprimento do caule. df = graus de liberdade; Sum Sq = soma dos quadrados; Mean Sq = quadrado médio; F = estatística F e Pr = valor de p. Valores de  $p \leq 0,05$  indicam diferença estatística significativa (\*).

O comprimento do caule foi maior na cultivar PO em comparação a cultivar SI, independentemente da inoculação ou não da cepa DSE2. Para ambas cultivares, o tratamento WW proporcionou maior comprimento do caule em relação ao WD. A restrição hídrica resultou na redução de aproximadamente 21,9% no comprimento do caule em PO e de aproximadamente 17,6% em SI (Figura 18).



**Figura 18.** Comprimento do caule das plantas de *V. unguiculata* das cultivares Pingo de ouro 1,2 (PO) e (SI) santo Inácio (SI), cultivadas sob condições hídricas de irrigação plena de 100% (WW) e sob déficit hídrico severo 25% (WD) da capacidade de campo. Os dados representam um espaço amostral composto por repetições independentes (n=5). As hastes (bigodes) indicam os valores máximos e mínimos observados. A caixa representa o intervalo interquartil (Q1-Q3) e a linha horizontal no interior da caixa corresponde à mediana. Os pontos representados fora das hastes, em coloração preta mais intensa, correspondem aos outliers, indicando valores individuais fora da distribuição esperada dos dados. Os pontos localizados entre a caixa e os bigodes representam valores normais, correspondentes às repetições amostrais. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), aplicado a comparação das médias (n=5).

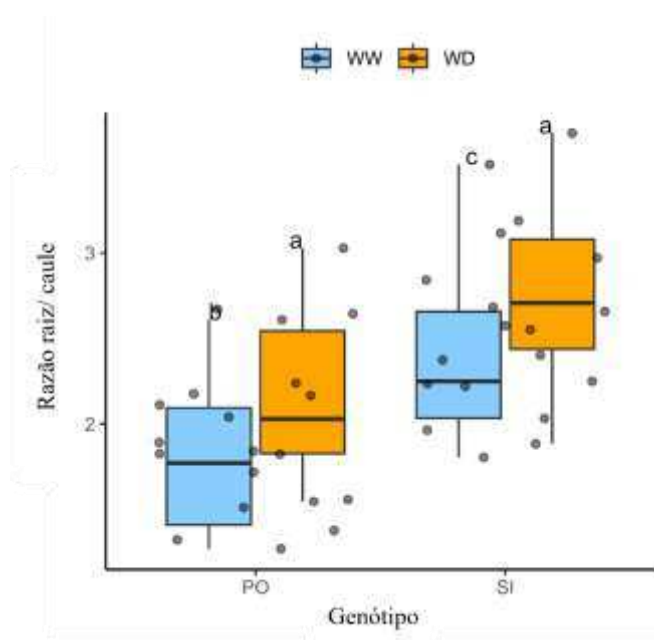
A razão entre comprimento da raiz e comprimento do caule foi significativamente influenciado pelos fatores genótipo e condição hídrica, de forma isolada (Tabela 13). O fator inoculação com DSE não influenciou nessa variável.

**Tabela 13.** Resultado da análise de variância (ANOVA) da razão comprimento da raiz /caule, de plantas de *V. unguiculata* colonizadas com cepa de DSE2.

Fatores	Df	Sum Sq	Mean Sq	F valor	Pr (>F)
Genótipo	1.0	3.61	3.61	14.56	6.08e-04***
Condição hídrica	1.0	1.20	1.20	4.84	3.54e-02***
DSE	1.0	0.08	0.08	0.34	5.66e-01
Condição hídrica: DSE	1.0	0.32	0.32	1.27	2.68e-01
Genótipo: DSE	1.0	0.05	0.05	0.18	6.71e-01
Genótipo: Condição hídrica	1.0	0.00	0.00	0.00	9.80e-01
Genótipo: Condição hídrica: DSE	1.0	0.51	0.51	2.05	1.62e-01
Resíduos	31.0	7.68	0.25		

Foram avaliados os efeitos individuais de genótipos, condição hídrica e cepa de DSE, bem como suas interações sobre a razão comprimento da raiz /caule. df = graus de liberdade; Sum Sq = soma dos quadrados; Mean Sq = quadrado médio; F = estatística F e Pr = valor de p. Asteriscos de indicam diferenças estatísticas significativas ( $p \leq 0,05^*$ ,  $p \leq 0,01^{**}$ ,  $p \leq 0,001^{***}$ ).

Em ambas as cultivares, a razão raiz/caule foi maior no tratamento WD. O tratamento WD promoveu o aumento desta razão de aproximadamente 19% em PO e 9% em SI, em comparação com o tratamento WW (Figura 19).



**Figura 19.** Razão comprimento raiz/caule das plantas de *V. unguiculata* das cultivares Pingo de ouro 1,2 (PO) e (SI) Santo Inácio (SI), cultivadas sob condições hídricas de irrigação plena de 100% (WW) e sob déficit hídrico severo 25% (WD) da capacidade de campo. Os dados representam um espaço amostral composto por repetições independentes (n=5). As hastes (bigodes) indicam os valores máximos e mínimos observados. A caixa representa o intervalo interquartil (Q1-Q3) e a linha horizontal no interior da caixa corresponde à mediana. Os pontos representados fora das hastes, em coloração preta mais intensa, correspondem aos outliers, indicando valores individuais fora da distribuição esperada dos dados. Os pontos localizados entre a caixa e os bigodes representam valores normais, correspondentes às repetições amostrais. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa, pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), aplicado a comparação das médias (n=5).

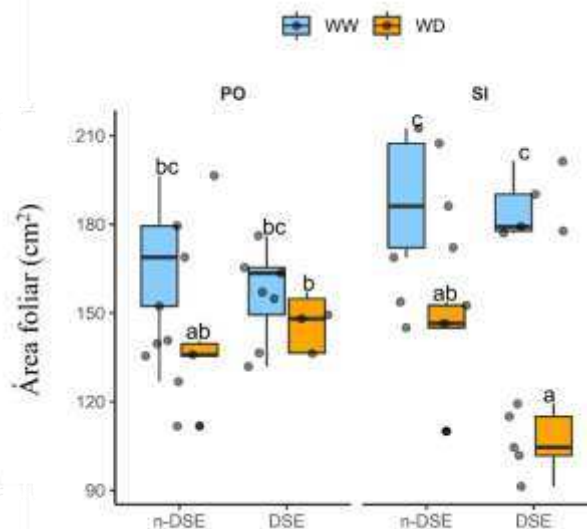
A área foliar foi influenciada significativamente pela condição hídrica e pelas interações genótipo e DSE, genótipo e condição hídrica e pela interação tripla entre genótipo, condição hídrica e DSE ( $p < 0,05$ ) (Tabela 14).

**Tabela 14.** Análise de variância (ANOVA) da área foliar de plantas de *V. unguiculata* colonizadas com cepa de DSE2.

Fatores	Df	Sum Sq	Mean Sq	F valor	Pr (>F)
Genótipo	1.0	279.47	279.47	1.02	3.21e-01
Condição hídrica	1.0	17.939.29	17.939.29	65.30	3.16e-09***
DSE	1.0	684.43	684.43	2.49	1.24e-01
Condição hídrica: DSE	1.0	56.30	56.30	0.20	6.54e-01
Genótipo: DSE	1.0	1.311.48	1.311.48	4.77	3.63e-02*
Genótipo: Condição hídrica	1.0	4.386.27	4.386.27	15.97	3.54e-04**
Genótipo: Condição hídrica: DSE	1.0	1.711.74	1.711.74	6.23	1.79e-02*
Resíduos	32.0	8,791.19	274.72		

Foram avaliados os efeitos individuais de genótipos, condição hídrica e cepa de DSE, bem como suas interações sobre a área foliar. df = graus de liberdade; Sum Sq = soma dos quadrados; Mean Sq = quadrado médio; F = estatística F e Pr = valor de p. Asteriscos de indicam diferenças estatísticas significativas ( $p \leq 0,05^*$ ,  $p \leq 0,01^{**}$ ,  $p \leq 0,001^{***}$ ).

Portanto, há uma diferença clara na área foliar das plantas entre condições WW e WD. O estresse hídrico reduziu significativamente a área foliar em ambas cultivares. Em PO, a inoculação com DSE não promoveu alterações significativas nesse parâmetro sob nenhuma condição hídrica. Já em SI, a redução da área foliar sob déficit hídrico, reduzida em aproximadamente 29,1% nas plantas inoculadas, indicando que, para essa cultivar, a associação com DSE não mitigou os efeitos do estresse hídrico sobre o crescimento (Figura 20).



**Figura 20.** Área foliar das plantas de *V. unguiculata* das cultivares Pingo de ouro 1,2 (PO) e (SI) santo Inácio (SI), cultivadas sob condições hídricas de irrigação plena de 100% (WW) e sob déficit hídrico severo 25% (WD) da capacidade de campo. Os dados representam um espaço amostral composto por repetições independentes (n=5). As hastes (bigodes) indicam os valores máximos e mínimos observados. A caixa representa o intervalo interquartil (Q1-Q3) e a linha horizontal no interior da caixa corresponde à mediana. Os pontos representados fora das hastes, em coloração preta mais intensa, correspondem aos outliers, indicando valores individuais fora da distribuição esperada dos dados. Os pontos localizados entre a caixa e os bigodes representam valores normais, correspondentes às repetições amostrais. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ), aplicado a comparação das médias (n=5).

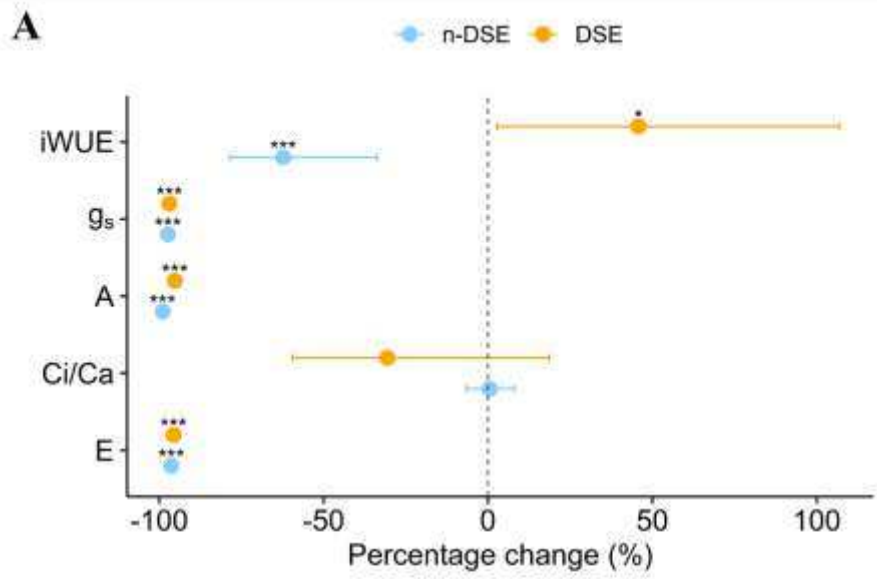
#### 6.4 Trocas gasosas das plantas

O déficit hídrico alterou significativamente as respostas fisiológicas de *V. unguiculata*, com diferenças dependendo da inoculação com DSE e do genótipo. O déficit hídrico reduziu em aproximadamente 95% a condutância estomática (gs), a taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> (A) e a transpiração (E) em ambas cultivares, independentemente da presença de DSE. Na cultivar SI, a relação CO<sub>2</sub> interno e externo (C<sub>i</sub>/C<sub>a</sub>) foi reduzida em cerca de 56.8% a 42%, tanto em plantas inoculadas quanto não inoculadas, respectivamente, enquanto a cultivar PO não foram observadas diferenças significativas entre tratamentos. A eficiência intrínseca do uso da água (iWUE) aumentou aproximadamente 129% a 86% na cultivar SI nas plantas inoculadas e não

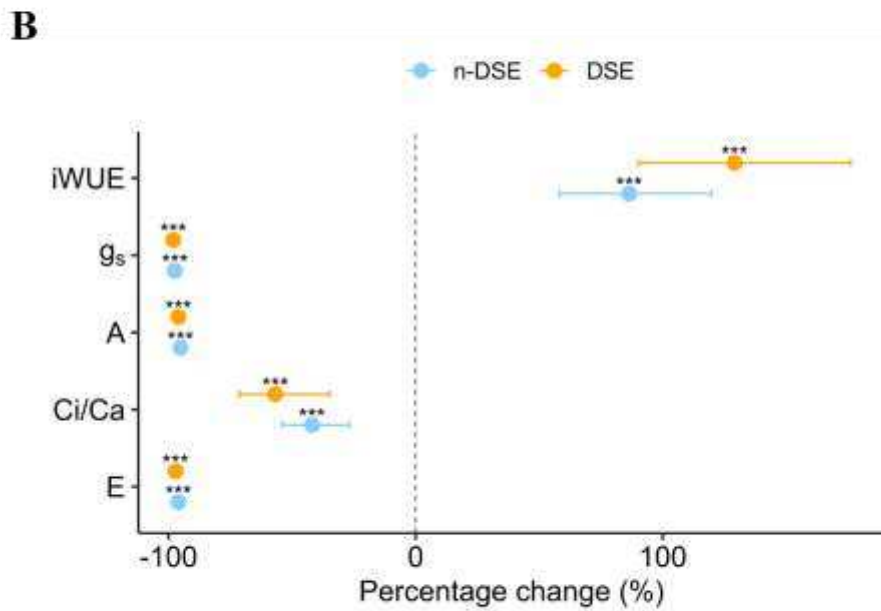
inoculadas com DSE, respectivamente. Já na cultivar PO houve aumento de aproximadamente 45% nas plantas inoculadas com DSE e redução de 62.3% nas plantas não inoculadas (Tabela 15 e Figura 21).

**Tabela 15.** Parâmetros de trocas gasosas de duas cultivares de *V. unguiculata*, expressos em porcentagem de mudança das plantas sob déficit hídrico em relação às plantas sob irrigação.

Genótipo	DSE	Variável	% Change	p. valor
PO	0	A	-99.0	0.000
PO	DSE	A	-95.3	0.000
PO	0	Ci/Ca	0.5	0.886
PO	DSE	Ci/Ca	-30.6	0.181
PO	0	E	-96.3	0.000
PO	DSE	E	-95.7	0.000
PO	0	Gs	-97.4	0.000
PO	DSE	Gs	-96.9	0.000
PO	0	iWUE	-62.3	0.001
PO	DSE	iWUE	45.8	0.035
SI	0	A	-95.2	0.000
SI	DSE	A	-96.1	0.000
SI	0	Ci/Ca	-42.0	0.000
SI	DSE	Ci/Ca	-56.8	0.000
SI	0	E	-96.1	0.000
SI	DSE	E	-97.2	0.000
SI	0	Gs	-97.5	0.000
SI	DSE	Gs	-98.1	0.000
SI	0	iWUE	86.4	0.000
SI	DSE	iWUE	129.1	0.000



**PO**

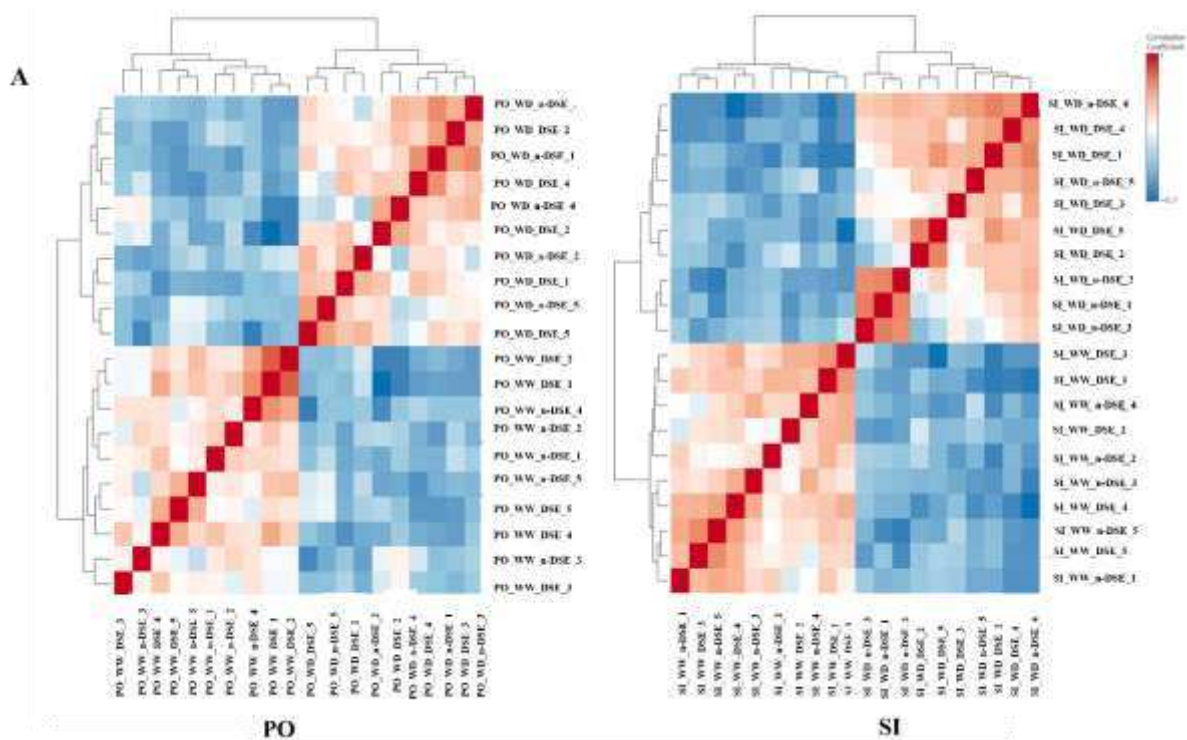


**SI**

**Figura 21.** Mudanças nas trocas gasosas em duas cultivares contrastantes SI e PO, expressas em porcentagem das plantas sob déficit hídrico em relação às plantas sob irrigação. Taxa líquida de assimilação de CO<sub>2</sub> (A), condutância estomática (gs), concentração interna de CO<sub>2</sub> (Ci) e transpiração (E). Asteriscos indicam diferença estatística significativa, sendo \* p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 (n=5).

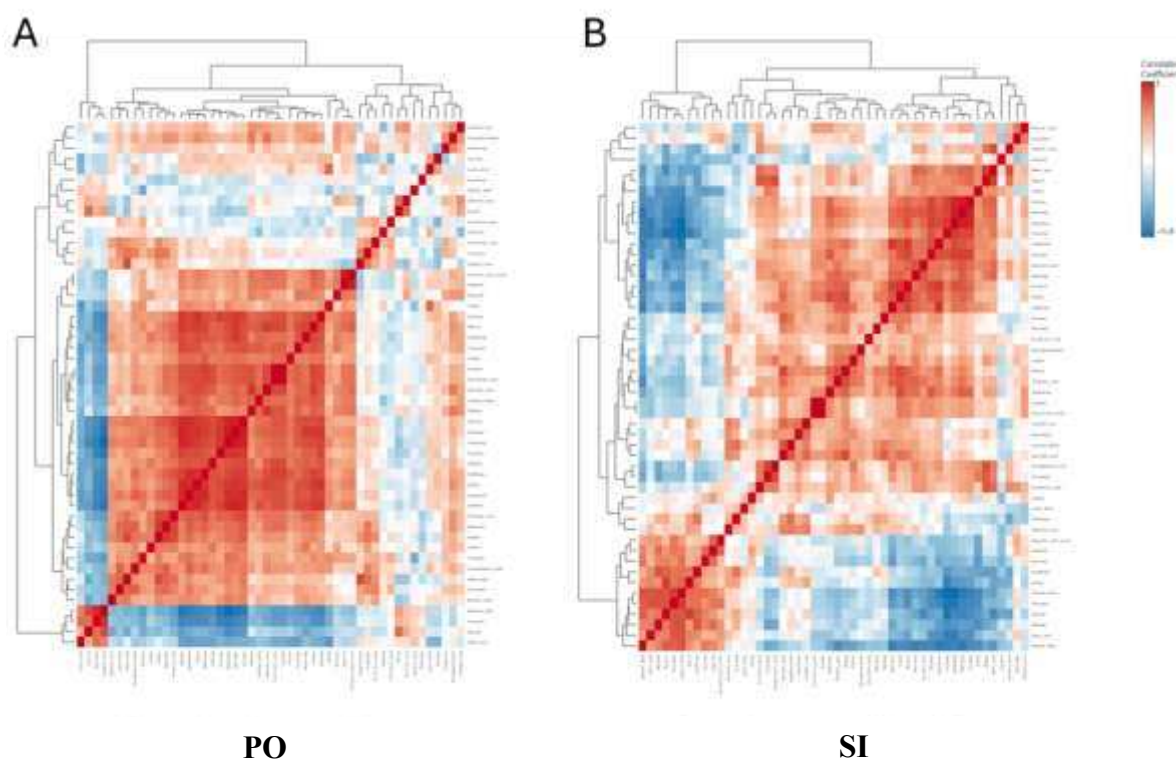
### 6.5 Efeito do estresse hídrico no metaboloma foliar de *V. unguiculata* inoculada com a cepa DSE2

A análise do perfil metabólico foliar por meio de heatmap evidenciou diferenças marcantes entre as cultivares e regime hídrico. A cultivar PO apresentou menor variação metabólica, com elevada coesão entre as repetições e forte correlação entre os grupos de regime hídrico, sugerindo uma resposta metabólica mais estável e consistente frente ao estresse (Figura 22A). Em contraste, a cultivar SI apresentou maior dispersão entre as repetições, caracterizada pela predominância de grupamentos menores, compostos principalmente por duas a três repetições, sugerindo maior heterogeneidade metabólica e menor coordenação da resposta ao estresse hídrico (Figura 22B).



**Figura 22.** Heatmap de correlação entre amostras foliares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) das cultivares Pingo de Ouro 1,2 A (tolerante a seca) e Santo Inácio B (susceptível a seca), baseado nos perfis metabólicos obtidos por GC-MS. Os coeficientes de correlação de Pearson foram calculados a partir dos dados transformados em  $\log_{10}$  e auto escalonados. As cores indicam a intensidade e a direção da correlação (azul: correlação negativa; branco: correlação próxima de zero; vermelho: correlação positiva). As amostras foram organizadas por agrupamento hierárquico (clustering), permitindo a visualização de padrões de similaridade metabólica entre os grupos experimentais definidos pela condição (WW e WD) e pela inoculação com fungos endofíticos melanizados septados (DSE e n-DSE).

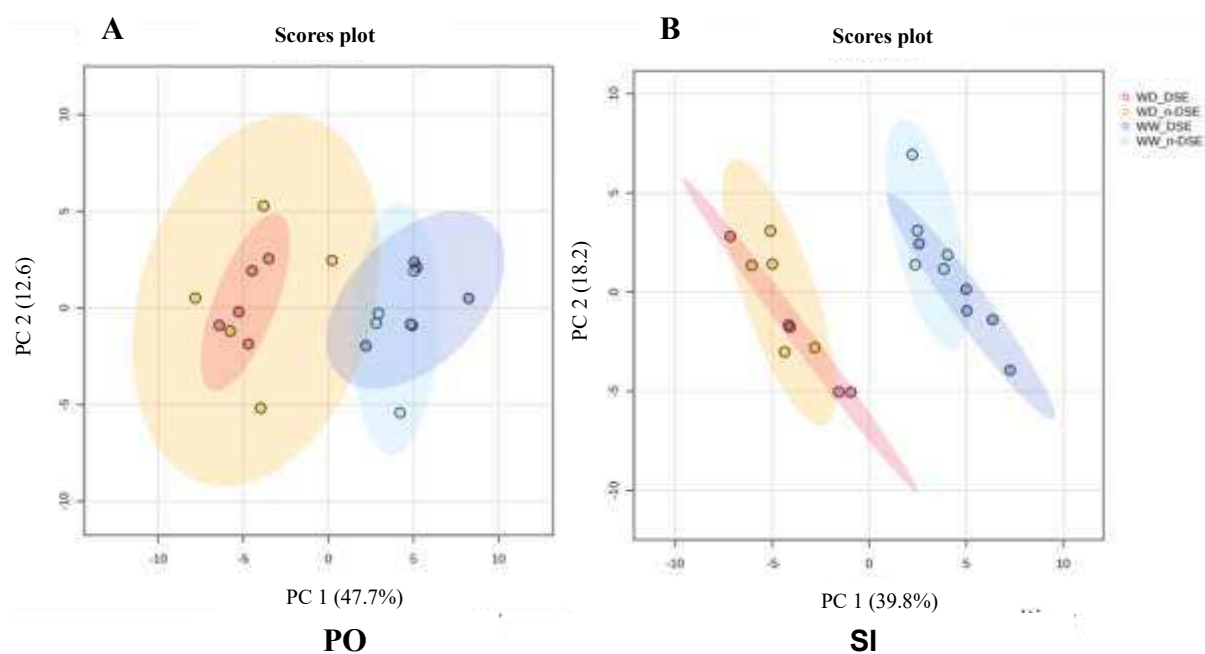
O heatmap de correlação entre metabólitos evidencia de forma mais clara as diferenças entre as duas cultivares avaliadas. Para cultivar PO, observa-se uma estrutura de correlação mais coesa, caracterizada pela formação de módulos bem definidos (Figura 23A). Por outro lado, a cultivar SI apresenta menor definição desses módulos, com predominância de correlações de menor magnitude, sugerindo um padrão de associação mais heterogêneo entre os metabólitos (Figura 23B).



**Figura 23:** Heatmap de correlação entre metabólitos foliares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) das cultivares Pingo de Ouro 1,2 **A** (tolerante a seca) e Santo Inácio **B** (susceptível a seca), baseado nos perfis metabólicos obtidos por GC-MS. As cores indicam a intensidade e a direção da correlação (azul: correlação negativa; branco: correlação próxima de zero; vermelho: correlação positiva). As amostras foram organizadas por agrupamento hierárquico (clustering), permitindo a visualização de padrões de similaridade metabólica entre os grupos experimentais definidos pela condição (WW e WD) e pela inoculação com fungos endofíticos melanizados septados (DSE e n-DSE).

A PCA foi utilizada como abordagem multivariada exploratória para investigar os padrões globais de variação do perfil metabólico foliar e identificar os fatores biológicos que

mais contribuem para diferenciação entre os tratamentos. Os resultados da PCA confirmam aqueles observados na análise de correlação, indicando que o déficit hídrico foi o principal fator responsável pela variação do metaboloma, promovendo a separação entre os tratamentos sob irrigação plena (WW) e estresse hídrico (WD), enquanto a inoculação por DSE modulou o perfil de forma mais sutil e secundária. Para a cultivar PO, a PC1 explicou 47,7% da variância, sendo responsável pela separação entre os tratamentos do regime hídrico (WW x WD), enquanto a PC2 contribuiu com 12,6%, refletindo ajustes mais finos entre as amostras (Figura 24A). Na cultivar SI, a PC1 explicou 39,8% da variância, também associada a separação entre WW e WD, enquanto a PC2 contribuiu 18,2% para explicar a variação dos dados. Assim como na cultivar PO, na cultivar SI a presença do DSE promoveu diferenças pouco expressivas no metaboloma em resposta ao regime hídrico, sem alterar significativamente o padrão principal da separação determinado pelo déficit hídrico (Figura 24B).

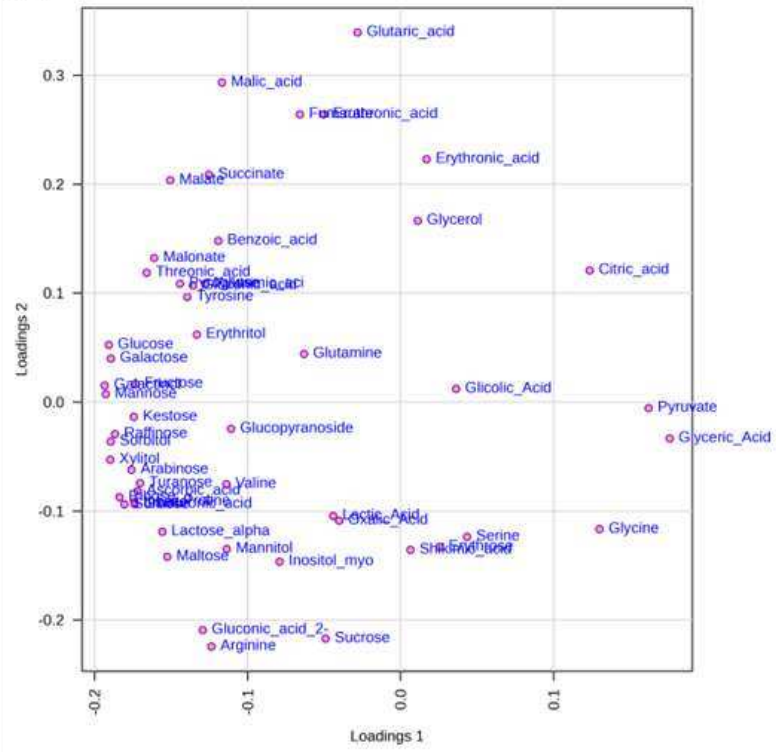
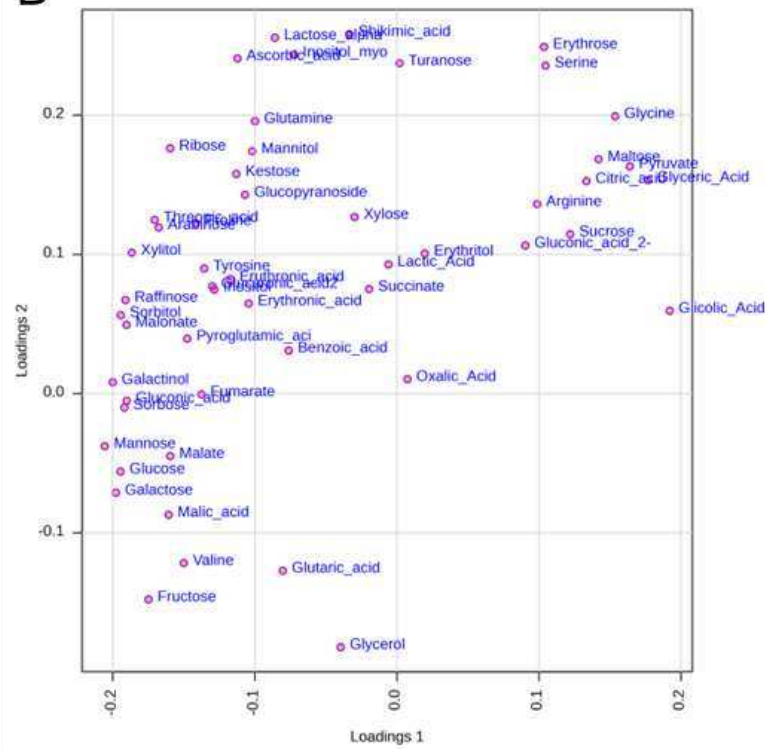


**Figura 24.** Análise de componentes principais (PCA) dos perfis metabólicos foliares de feijão caupi (*V. unguiculata*), das cultivares Pingo de Ouro 1,2 (PO) **A** (tolerante a seca) e Santo Inácio (SI) **B** (susceptível a seca), baseado nos perfis metabólicos obtidos por GC-MS. A PCA foi realizada após transformação logarítmica ( $\log_{10}$ ) e autoscaling, sem normalização por amostra. O gráfico de scores mostra a distribuição das amostras ao longo dos dois primeiros componentes principais, PC1 (47,7%) da variância explicada e PC2 (12,6%) e o SI PC1 (39,8%) da variância explicada e para PC2 (18,2%), considerando os grupos experimentais definidos pela condição hídrica (WW e WD) e pela inoculação com fungos endofíticos melanizados septados (DSE e n-DSE). Cada ponto representa uma amostra biológica, e as elipses indicam a região de

confiança de 95% para cada grupo. A separação multivariada entre os grupos foi avaliada por PERMANOVA ( $p=0,001$ ), indicando diferenças significativas no perfil metabólico. A PC1 representa o principal gradiente de variação metabólica associada aos tratamentos experimentais.

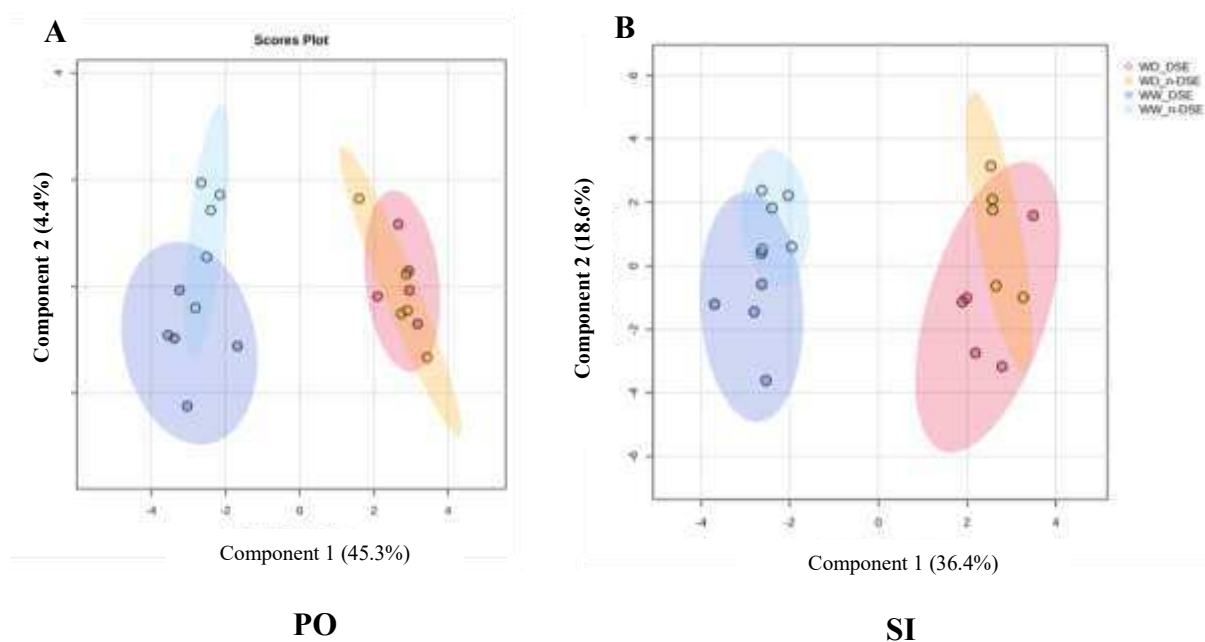
A análise dos loadings da PCA permitiu identificar os metabólitos que mais contribuíram para a separação ao longo da PC 1 (Figura 25). Na cultivar PO, os metabólitos com maiores contribuições positivas foram ácido glicólico, piruvato, glicina e ácido cítrico, estando associados às plantas sob irrigação plena (WW). Por outro lado, 20 metabólitos (galactinol, mannose, glicose, xilitol, sorbitol, galactose, rafinose, ribose, sorbose, arabinose, kestose, inositol, ácido glucurônico, frutose, ácido ascórbico, turanose, ácido treônico, malonato, lactose alpha, maltose) apresentam loadings negativos expressivos, sendo associados às plantas sob estresse hídrico (WD), indicando seu possível envolvimento na resposta ao estresse (Figura 25A). Os metabólitos com contribuição positivas para PC1 em PO também foram parcialmente observados em SI, indicando respostas metabólicas parcialmente conservadas entre as cultivares. Além disso, SI apresentou metabólitos adicionais, sugerindo uma resposta metabólica mais ampla nessa cultivar como ácido glicérico, maltose, sacarose, serina, eritrose arginina, sugerindo especificidade na resposta metabólica dessa cultivar. Além disso, alguns metabólitos com contribuição negativa para PC1 em PO também foram observados em SI, porém com inversão na direção dos loadings. Metabólitos como turanose, maltose e arginina apresentaram valores negativos em PO e positivos em SI, indicando diferenças na resposta metabólica entre as cultivares sob déficit hídrico (Figura 25B).

Metabólitos com maiores valores absolutos de loading em PC1, tanto na folha assim como na raiz foram destacados para fins de interpretação, e estes coincidem amplamente com aqueles identificados como discriminantes no modelo supervisionado sPLS-DA, reforçando sua relevância biológica na diferenciação entre os grupos experimentais.

**A****PO****B****SI**

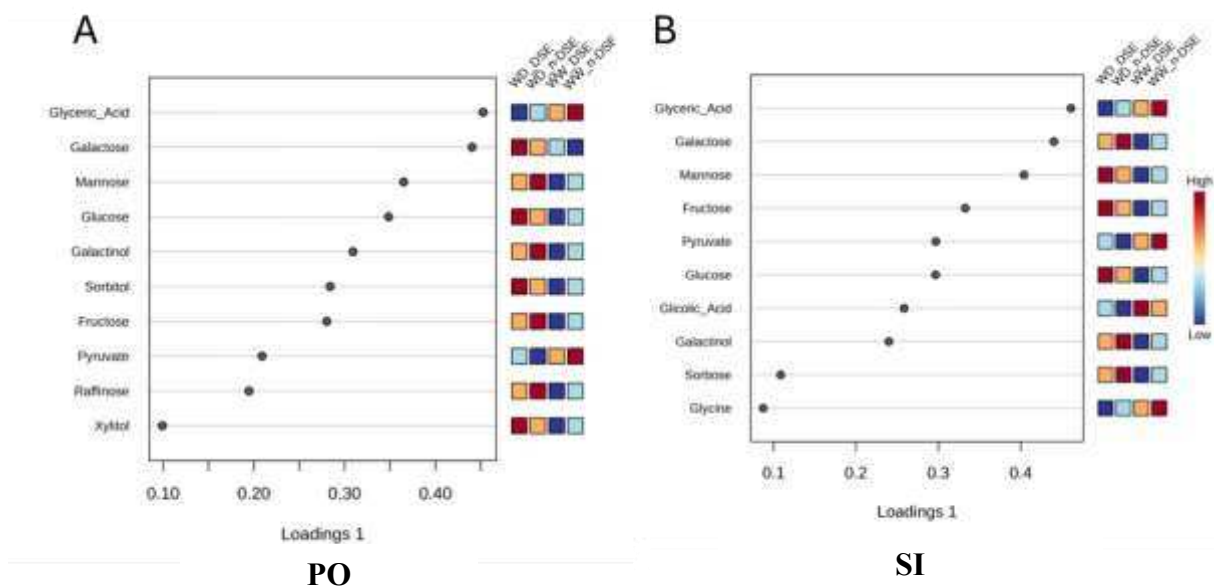
**Figura 25.** Loadings da análise de componentes principais (PCA), indicando a contribuição dos metabólitos foliares de feijão -caupi (*V. unguiculata*), das cultivares PO A (tolerante a seca) e SI B (susceptível a seca), para os componentes PC1 e PC2. Cada ponto nos loadings da PCA representa um metabólito, posicionado de acordo com seus valores de loading dos respectivos componentes. Metabólitos localizados nos extremos positivos e negativos da PC1 apresentam maior contribuição para a separação observada no gráfico de scores e definem o principal gradiente metabólico do experimento.

A análise sPLS-DA foi utilizada como abordagem supervisionada com objetivo de complementar a PCA e aprimorar a discriminação entre os grupos experimentais em função do regime hídrico e da inoculação com DSEs. O gráfico de scores sPLS-DA revelou, de forma consistente, a separação entre plantas sob irrigação plena (WW) e sob estresse hídrico (WD) ao longo do primeiro componente, confirmando novamente o regime hídrico como o principal fator determinante do perfil metabólico foliar. Na cultivar PO o componente 1 explicou 45,3% da variância, indicando claramente a separação WW (a esquerda) de WD (a direita) e confirmando o que foi observado na PCA. A componente 2 contribuiu com apenas 4,4% da variância, indicando influência secundária e adicional (Figura 26A). Em SI, a componente 1 explica 36,4% da variação dos dados e também separa claramente WW e WD, confirmando o efeito principal do regime hídrico. A componente 2, por sua vez, explicou 18,6% da variação. Em ambas as cultivares tanto a PC1 quanto a PC2 indicam que a inoculação com DSE reestrutura o metaboloma foliar dentro de cada regime hídrico (Figura 26B).

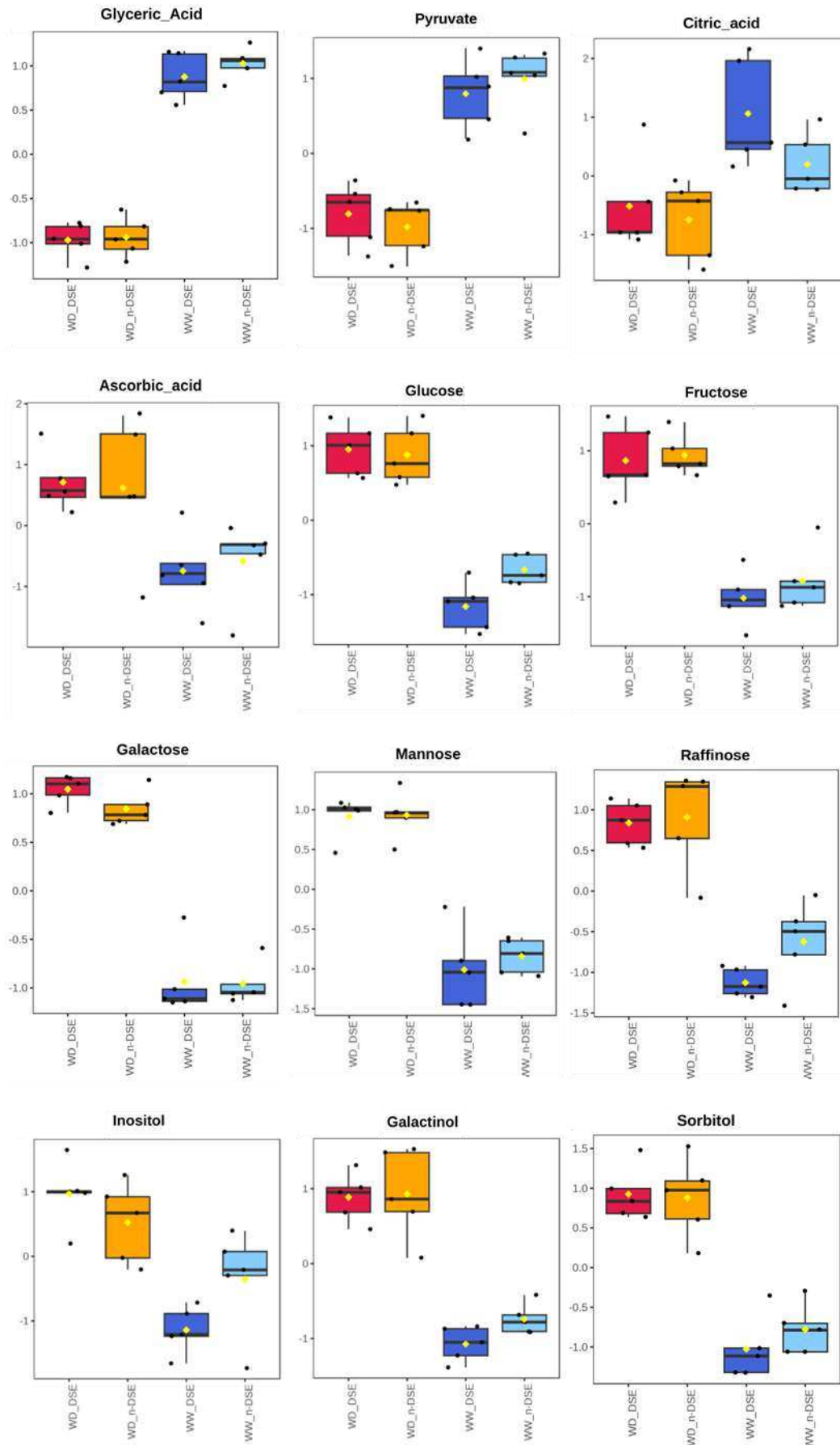


**Figura 26.** Análise discriminante por mínimos quadrados parciais esparsos (sPLS-DA) dos perfis metabólicos foliares de feijão-caupi (*V. unguiculata*), das cultivares Pingo de Ouro 1,2 **A** (tolerante a seca) e santo Inácio **B** (susceptível a seca), baseado nos perfis metabólicos obtidos por GC-MS. O gráfico de scores mostra a distribuição das amostras ao longo dos dois primeiros componentes do modelo supervisionado, componente 1 (44,9% da variância explicada) e Componente 2 (5,9%), considerando os grupos experimentais definidos pela condição hídrica (WW e WD) e pela inoculação com fungos endofíticos melanizados septados (DSE e n-DSE). Cada ponto representa uma amostra biológica, e as elipses indicam uma região de confiança de 95% para cada grupo.

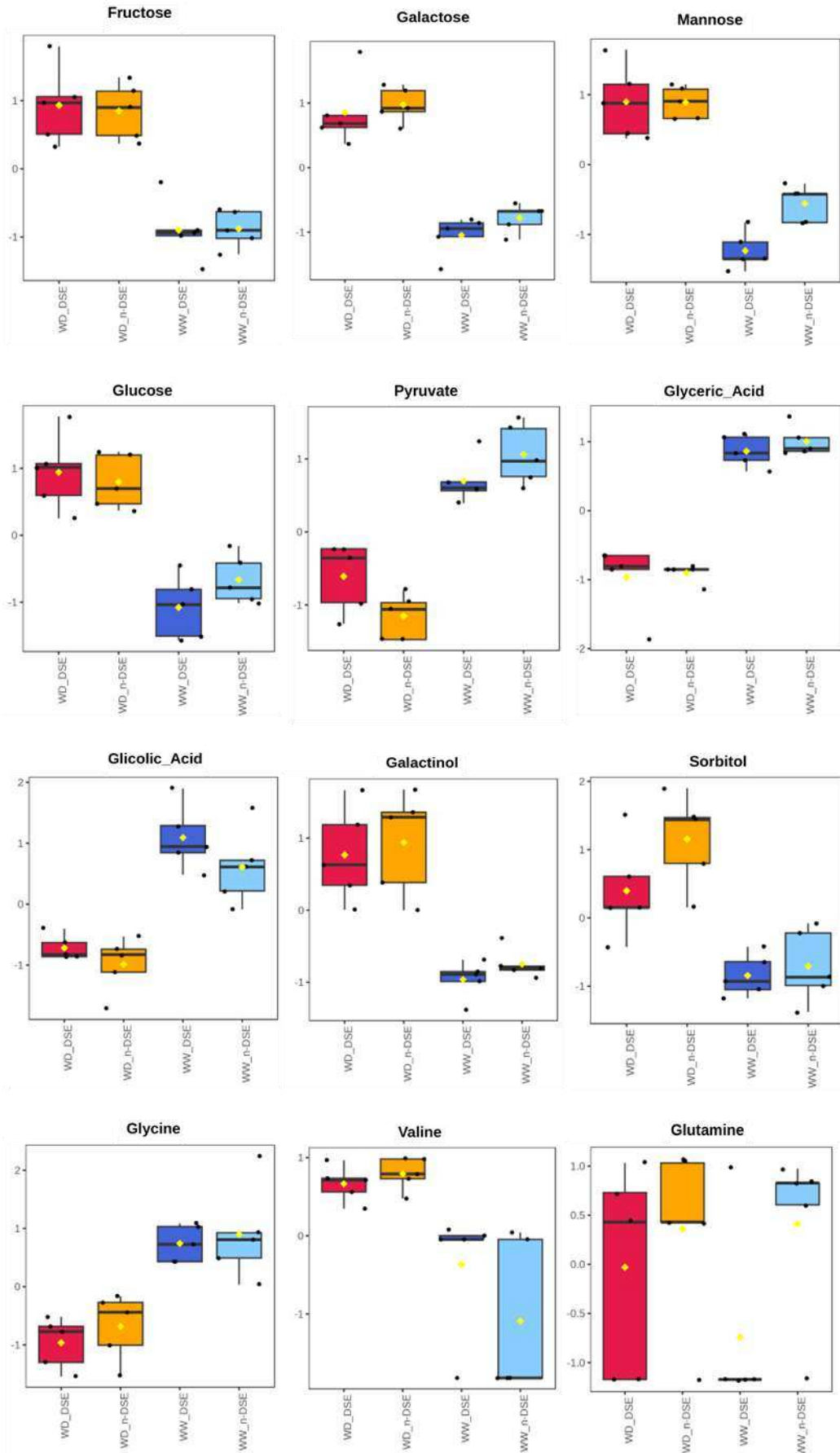
O VIP score, uma métrica derivada do sPLS-DA, foi usada para indicar a importância de cada metabolito na separação entre os grupos. Na cultivar PO, metabólitos associados ao metabolismo energético central destacaram-se especialmente o ácido glicérico, que apresentou o maior valor de VIP, enquanto o piruvato, embora com menor VIP, também contribuiu para a diferenciação em tratamentos sob condições de irrigação plena. Em contraste, açúcares solúveis, poliols e metabólitos da via de oligossacarídeos da família da rafinose (RFO), incluindo glicose, galactose, frutose, galactinol, rafinose e sorbitol, foram destacaram-se como metabólitos-chave responsáveis pela separação observada no sPLS-DA, para especialmente nos tratamentos sob estresse hídrico (Figura 27A). Na cultivar SI, o ácido glicérico também apresentou o maior valor de VIP, seguido pelo piruvato e pela glicina, os quais estiveram associados principalmente a tratamentos sob condições de irrigação plena, embora a glicina tenha apresentado menor valor de VIP. Os níveis de açúcares solúveis e polióis foram mais elevados em estresse hídrico (WD) e reduzidos sob irrigação plena (WW). Metabólitos da via dos oligossacarídeos da família da rafinose, como o galactinol, também apresentaram aumento porem esse acúmulo foi menos pronunciado do que o observado na cultivar PO, sugerindo menor eficiência nos mecanismos de proteção metabólica sob déficit hídrico (Figura 27B).



**Figura 27:** Metabólitos foliares de feijão-caupi (*V. unguiculata*), das cultivares Pingo De Ouro **A** (tolerante a seca) e Santo Inácio **B** (susceptível a seca), selecionados com base nos escores VIP (Variable Importance in Projection) obtidos a partir do modelo supervisionado de sPLS-DA. O gráfico de loadings (Loadings 1) apresentam a contribuição dos metabólitos mais relevantes para a discriminação entre os grupos experimentais definidos pelas condições hídricas (WW e WD) e pela inoculação com fungos endofíticos melanizados septados (DSE e n-DSE). A direita, os mapas de cores representam o padrão relativo de abundância desses metabólitos entre os tratamentos, onde azul indica menor abundância e o vermelho maior abundância.



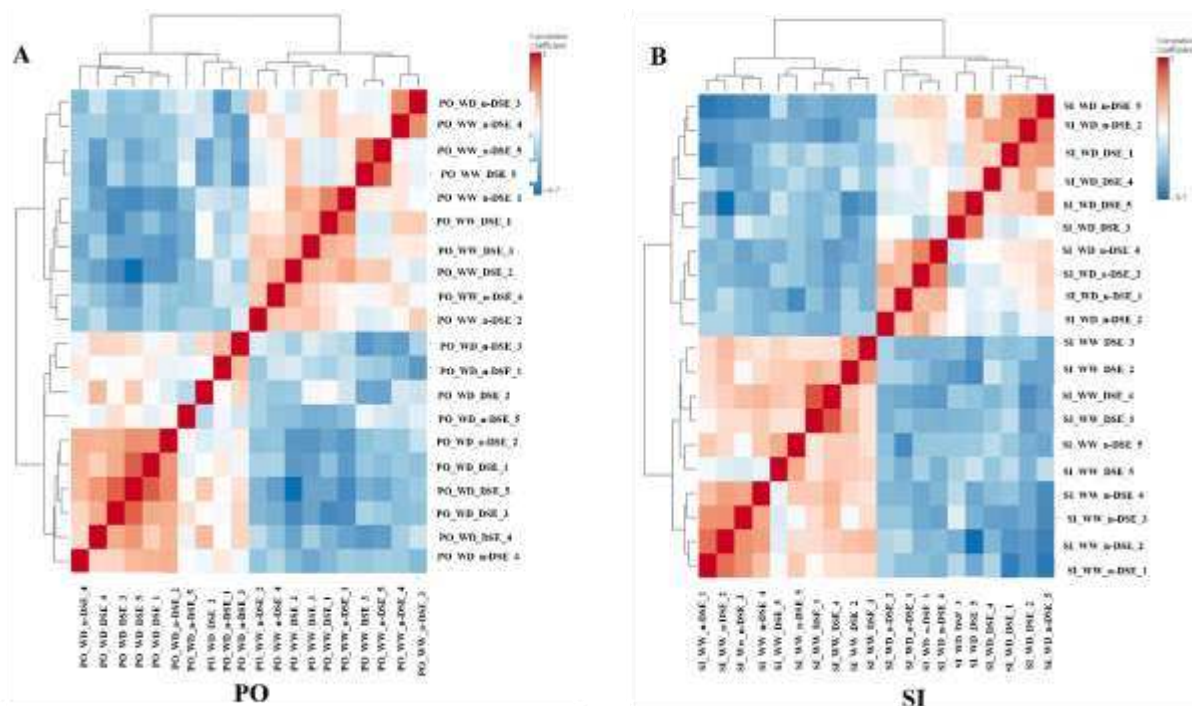
**Figura 28.** Níveis relativos dos metabólitos foliares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), da cultivar Pingo De Ouro (tolerante a seca), obtidos por GC-MS. Os dados foram normalizados pelo padrão interno ribitol, transformados em  $\log_2$  e auto-escalados. Os metabólitos apresentados foram selecionados com base nos maiores valores absolutos de loading na PC1 da análise de componentes principais (PCA) e nos maiores valores de VIP do modelo sPLS-DA. Os metabólitos ilustram padrões consistentes com o gradiente metabólico identificado nas análises multivariadas. Os gráficos apresentaram, para cada metabólito, os valores após transformação e normalização dos dados, estratificados pelos grupos experimentais WD-DSE, WD, n-DSE, WW-DSE, WW n-DSE. As caixas representam o intervalo interquartil, a linha central indica a mediana e os pontos correspondem às observações individuais (n=5).



**Figura 29.** Distribuição dos níveis de metabólitos foliares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), da cultivar Santo Inácio (susceptível seca), selecionados com base nos maiores valores absolutos de loading na PC1 da análise de componentes principais (PCA) e nos maiores valores de VIP do modelo sPLS-DA. Os metabólitos ilustram padrões consistentes com o gradiente metabólico identificado nas análises multivariadas. Os gráficos apresentaram, para cada metabólito, os valores após transformação e normalização dos dados, estratificados pelos grupos experimentais WD-DSE, WD n-DSE, WW-DSE, WW n-DSE. As caixas representam o intervalo interquartil, a linha central indica a mediana e os pontos correspondem às observações individuais (n=5).

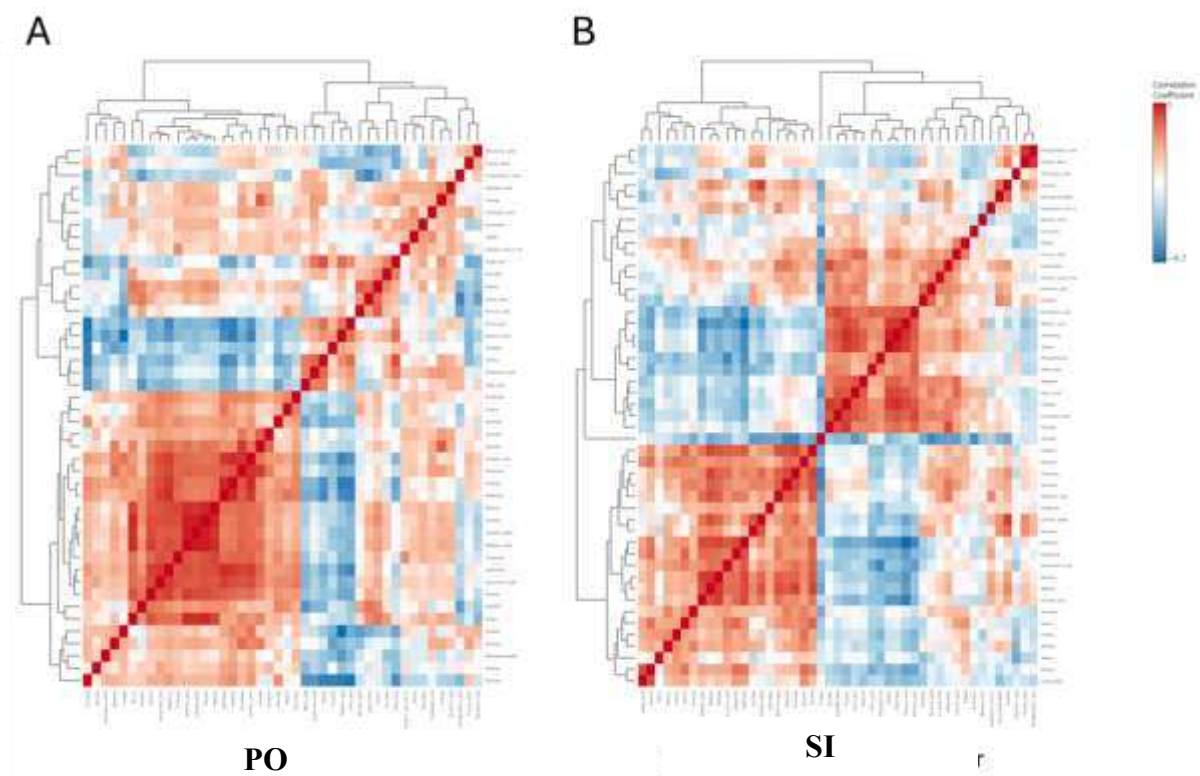
#### **6.6 Efeito do estresse hídrico no metaboloma radicular de *V. unguiculata* inoculada com a cepa DSE2**

O heatmap de correlação do metaboloma radicular evidenciou definição clara de blocos, indicando elevada similaridade entre réplicas biológicas dentro de cada tratamento e uma separação nítida entre plantas sob irrigação plena e estresse hídrico, sugerindo que o regime hídrico exerce uma forte influência sobre o metaboloma da raiz, de maneira análoga ao observado na folha. O efeito da inoculação com o DSE2 mostrou-se secundário em relação ao efeito do déficit hídrico. Ao detalhar as cultivares separadamente, observa-se que a cultivar SI apresentou blocos de correlação mais homogêneos, com correlação relativamente forte dentro dos tratamentos WW e WD, indicando maior consistência na resposta metabólica (Figura 30B). Em contraste, a cultivar PO apresentou um padrão de correlação menos consistente entre as amostras, com menor correlação interna entre os grupos de regime hídrico, sugerindo menor similaridade nos perfis metabólicos (Figura 30A).



**Figura 30.** Heatmap de correlação entre amostras das radículas de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) das cultivares Pingo de Ouro 1,2 **A** (tolerante a seca) e Santo Inácio **B** (susceptível a seca), baseado nos perfis metabólicos obtidos por GC-MS. Os coeficientes de correlação de Pearson foram calculados a partir dos dados transformados em  $\log_{10}$  e auto escalonados. As cores indicam a intensidade e a direção da correlação (azul: correlação negativa; branco: correlação próxima de zero; vermelho, correlação positiva). As amostras foram organizadas por agrupamento hierárquico (clustering), permitindo a visualização de padrões de similaridade metabólica entre os grupos experimentais definidos pela condição (WW e WD) e pela inoculação com fungos endofíticos melanizados septados (DSE e n-DSE).

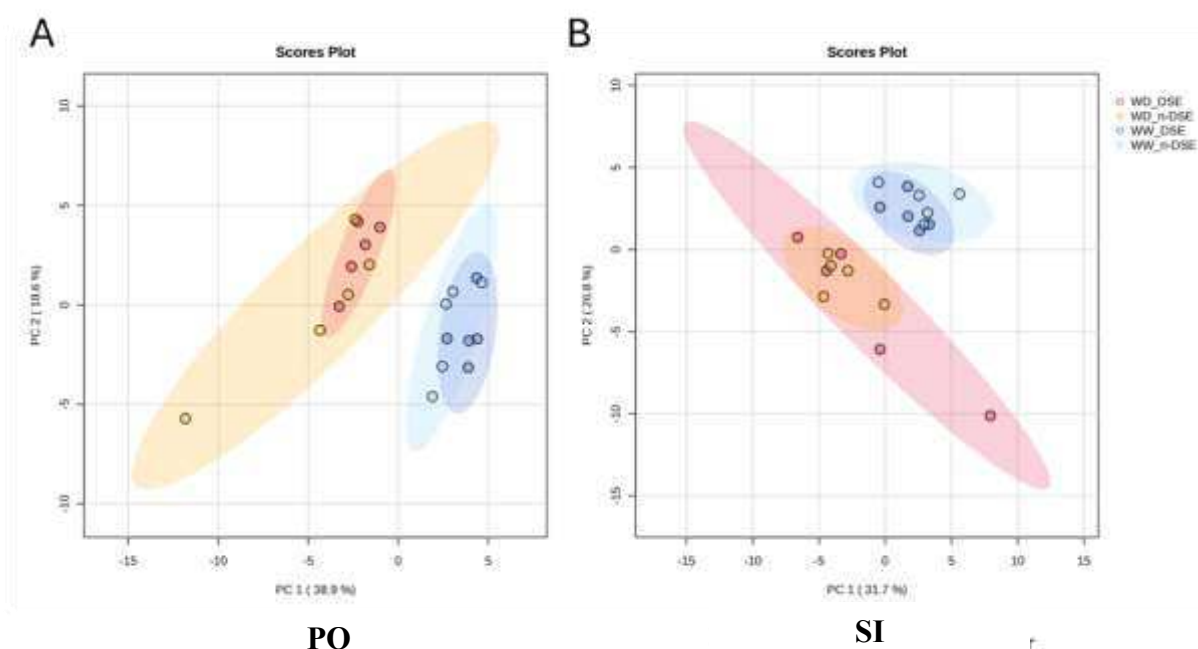
Observam-se correlações positivas e negativas em ambas as cultivares, indicando relações entre os perfis metabólicos das amostras. No entanto, a cultivar SI apresenta módulos de correlação mais definidos quando comparada a cultivar PO. O heatmap de correlação entre metabólitos (Figura 31) evidencia diferenças na estrutura de correlação entre as cultivares, com a cultivar SI apresentando blocos de correlação mais definidos, enquanto PO apresenta um padrão mais disperso.



**Figura 31.** Heatmap de correlação entre metabólitos radiculares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) das cultivares Pingou de Ouro 1,2 **A** (tolerante a seca) e Santo Inácio **B** (susceptível a seca), baseado nos perfis metabólicos obtidos por GC-MS. As cores indicam a intensidade e a direção da correlação (azul: correlação negativa; branco: correlação próxima de zero; vermelho correlação positiva). As amostras foram organizadas por agrupamento hierárquico (clustering), permitindo a visualização de padrões de similaridade metabólica entre os grupos experimentais definidos pela condição (WW e WD) e pela inoculação com fungos endofíticos melanizados septados (DSE e n-DSE).

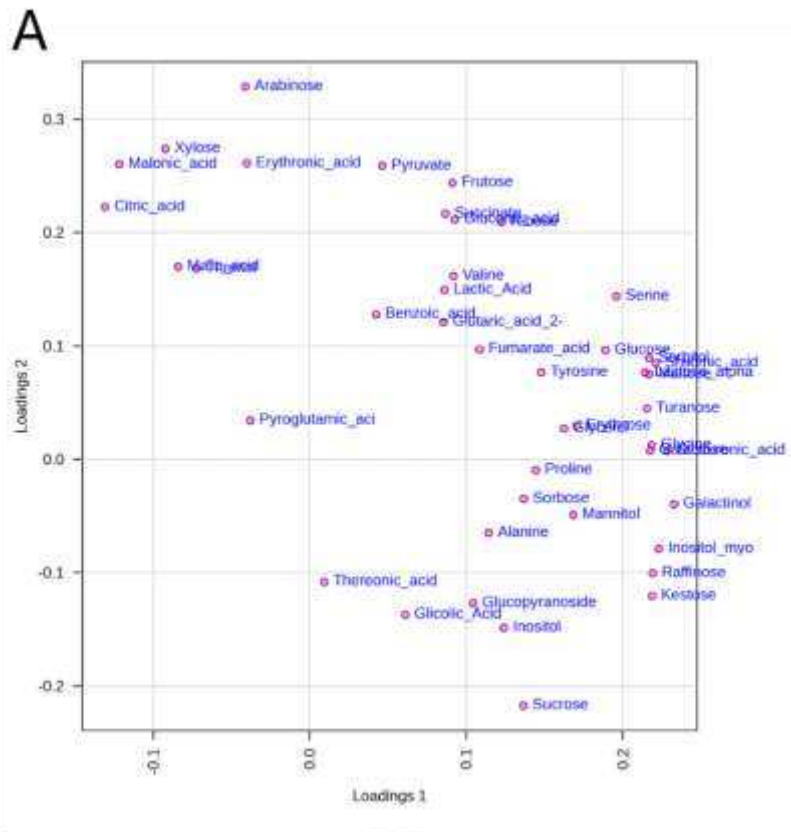
A PCA (Figura 32) confirmou que o déficit hídrico é o principal fator responsável pela variação do metaboloma radicular em ambas cultivares, promovendo a separação entre plantas sob WW e WD, e que a inoculação por DSE modulou o perfil metabólico de forma menos dispersa, especialmente sob WD. Observa-se, ainda, sobreposição entre os grupos em ambas cultivares, indicando que parte da variação metabólica não está completamente discriminada pelas componentes principais. Na cultivar SI, a PC1 explica 31,7% da variância, sendo responsável pela separação entre os tratamentos WD e WW, por sua vez a PC 2 contribuiu com 26,8%, refletindo variação adicional entre as amostras, evidenciando heterogeneidade nos

perfis metabólicos não explicada pela PC1(Figura 32B). Na cultivar PO, a PC 1 explicou 38,9% da variação dos dados também associada a separação entre regimes hídricos, enquanto que a PC 2 (18,6%) representou variações secundárias, relacionadas a ajustes mais finos entre as amostras. De modo geral, os resultados indicam que o estresse hídrico domina a reorganização do metaboloma radicular, enquanto a associação com DSE exerce efeito complementar, contribuindo de forma secundária para a modulação das respostas metabólicas ao déficit hídrico (Figura 32A).

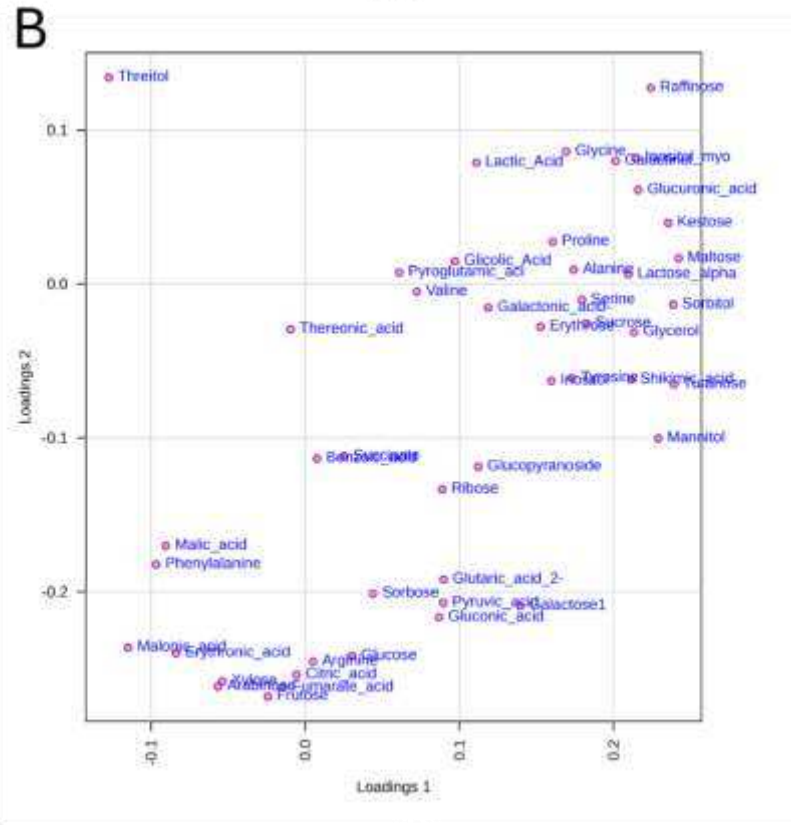


**Figura 32:** Análise de componentes principais (PCA) dos perfis metabólicos radiculares de feijão caupi (*V. unguiculata*) das cultivares Pingo de Ouro 1,2 **A** (tolerante a seca) e Santo Inácio **B** (susceptível a seca), baseado nos perfis metabólicos obtidos por GC-MS. A PCA foi realizada após transformação logarítmica ( $\log_{10}$ ) e autoscaling, sem normalização por amostra. O gráfico de scores mostra a distribuição das amostras ao longo dos dois primeiros componentes principais, PC1 (38.9%) da variância explicada e PC2 (18.6%) e o SI PC1 (31.7%) da variância explicada e para PC2 (26.8%), considerando os grupos experimentais definidos pela condição hídrica (WW e WD) e pela inoculação com fungos endofíticos melanizados septados (DSE e n-DSE). Cada ponto representa uma amostra biológica, e as elipses indicam a região de confiança de 95% para cada grupo. A separação multivariada entre os grupos foi avaliada por PERMANOVA ( $p=0,001$ ), indicando diferenças significativas no perfil metabólico. A PC1 representa o principal gradiente de variação metabólica associada aos tratamentos experimentais.

Na cultivar PO, os metabólitos localizados à direita da PC1 (loadings positivos) compreenderam um conjunto de aproximadamente 20 metabólitos, associados às amostras sob irrigação plena (WW), incluindo a kestose, rafinose, maltose, lactose alpha, sacarose, ácido glucónico, ribose, sorbitol, manitol, tirosina, galactose, sorbose, frutose, glicose, inositol myo, galactinol, turanose, glicopirranose, ácido chiquímico, ácido láctico. Por outro lado, a esquerda da PC1 (loadings negativos), observaram-se metabólitos como ácido cítrico, ácido malônico e treitol, xilose, ácido málico, ácido eritrônico, ácido piroglutâmico associados às amostras sob WD, indicando sua contribuição para a separação dos grupos (Figura 33A). A maioria dos metabólitos com contribuições positivas em PO, também foram observados em loadings positivos em SI, sugerindo padrões metabólicos parcialmente conservados entre as cultivares. Porém, aminoácido como glicina apresentou contribuições positivas exclusivamente em SI, indicando resposta específica desse genótipo. De maneira semelhante, os metabólitos com loadings negativos em PO também foram observados com contribuições negativas em SI. Entretanto, a frutose, ácido treônico apresentam inversão na direção dos loadings, sendo positivas em PO e negativas em SI, enquanto o ácido piroglutâmico apresentou comportamento oposto, com contribuições negativas em PO e positivas em SI, evidenciando respostas, respostas metabólicas contrastantes entre as cultivares. Adicionalmente, metabólitos como fenilalanina e o ácido fumárico contribuíram negativamente para a PC 1 exclusivamente em SI, estando associados às amostras sob estresse hídrico. Estes metabólitos não foram observados em na análise de loading plots de PO, reforçando a existência de mecanismos metabólicos específicos na resposta ao déficit hídrico entre as cultivares (Figura 33B).



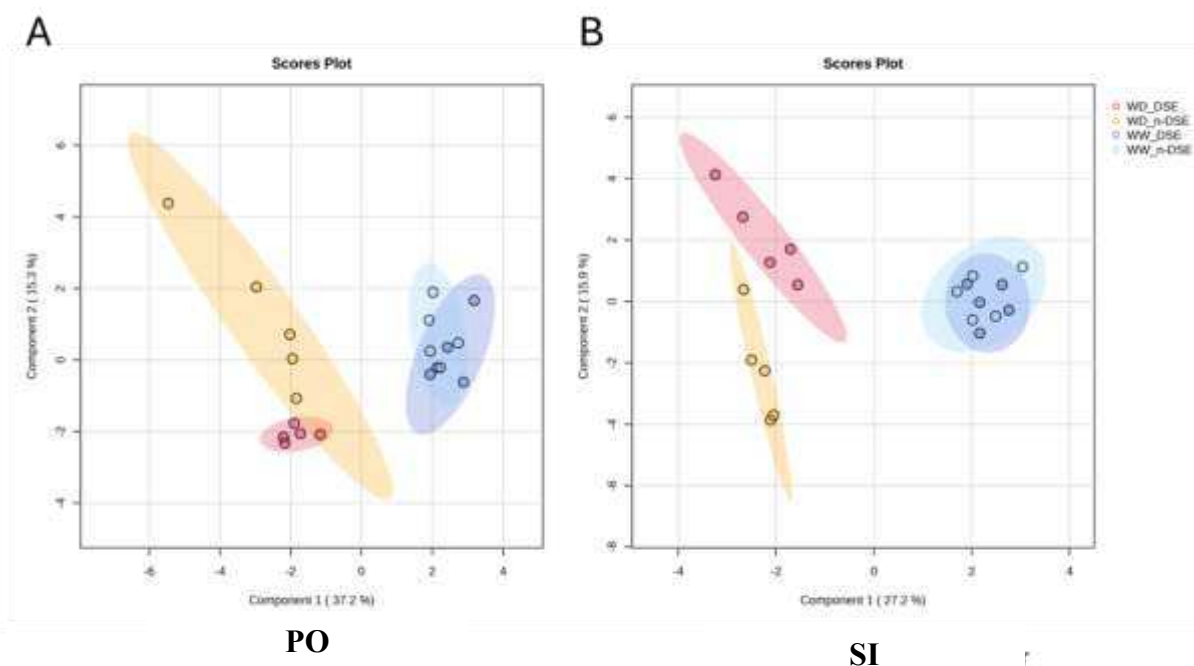
**PO**



**SI**

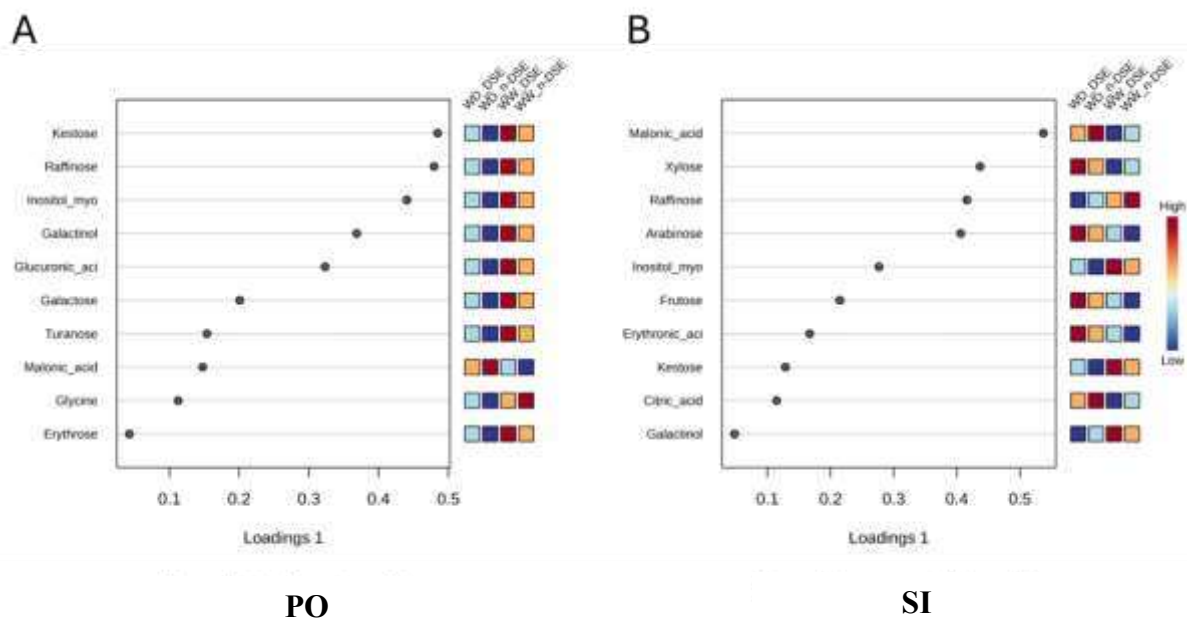
**Figura 33.** Gráfico de loadings da análise de componentes principais (PCA), indicando a contribuição dos metabólitos radiculares de feijão -caupi (*V. unguiculata*), das cultivares PO **A** (tolerante a seca) e SI **B** (susceptível a seca), para os componentes PC1 e PC2. Cada ponto representa um metabólito, posicionado de acordo com seus valores de loading dos respectivos componentes. Metabólitos localizados nos extremos positivos e negativos da PC1 apresentam maior contribuição para a separação observada no gráfico de scores e definem o principal gradiente metabólico do experimento.

O gráfico de scores da análise supervisionada sPLS-DA revelou claramente separação entre plantas sob WW e WD ao longo do primeiro componente, confirmando o regime hídrico como o principal fator determinante ao perfil metabólico radicular. Diferenças associadas à inoculação foram observadas no segundo componente, embora com menor contribuição para a variância total, indicando que o efeito da inoculação com o DSE2 atuou de forma moduladora. Na cultivar PO, o componente 1 explicou 37.2 % da variância, promovendo separação entre as condições hídricas, confirmando o que foi observado na PCA. A componente 2 refletiu variações secundárias de 15.3%, com maior sobreposição observada nos grupos WW (Figura 34A). Em SI, a componente 1 explicou 27.2% da variância, também separando claramente WW e WD, confirmando o efeito do regime hídrico. Destaca-se que, sob condições de déficit hídrico, houve separação nítida entre plantas inoculadas e não inoculadas com o DSE2, especialmente ao longo da PC2, que contribuiu com 15.9%, padrão não observado sob irrigação plena. Esses resultados indicam que a inoculação com o DSE2 reestruturou o metabolismo radicular sob estresse hídrico, sendo seus efeitos mais evidentes na cultivar susceptível (Figura 34B).

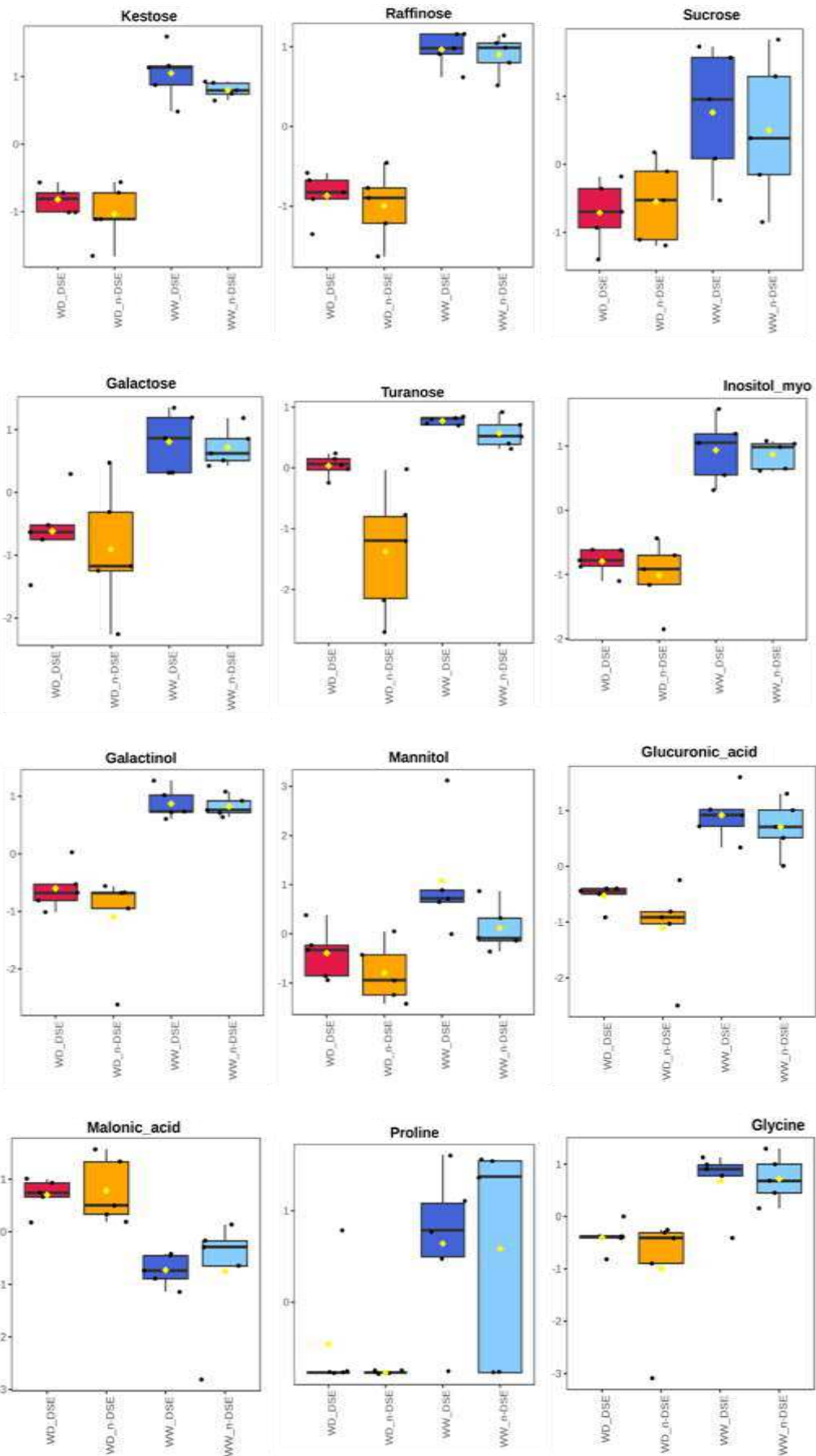


**Figura 34.** Análise discriminante por mínimos quadrados parciais esparsos (sPLS-DA) dos perfis metabólicos radiculares de feijão-caupi (*V. unguiculata*), das cultivares Pingo de Ouro 1,2 **A** (tolerante a seca) e santo Inácio **B** (susceptível a seca), baseado nos perfis metabólicos obtidos por GC-MS. O gráfico de scores mostra a distribuição das amostras ao longo dos dois primeiros componentes do modelo supervisionado, componente 1 (44,9% da variância explicada) e Componente 2(5,9%), considerando os grupos experimentais definidos pela condição hídrica (WW e WD) e pela inoculação com fungos endofíticos melanizados septados (DSE e n-DSE). Cada ponto representa uma amostra biológica, e as elipses indicam uma região de confiança de 95% para cada grupo.

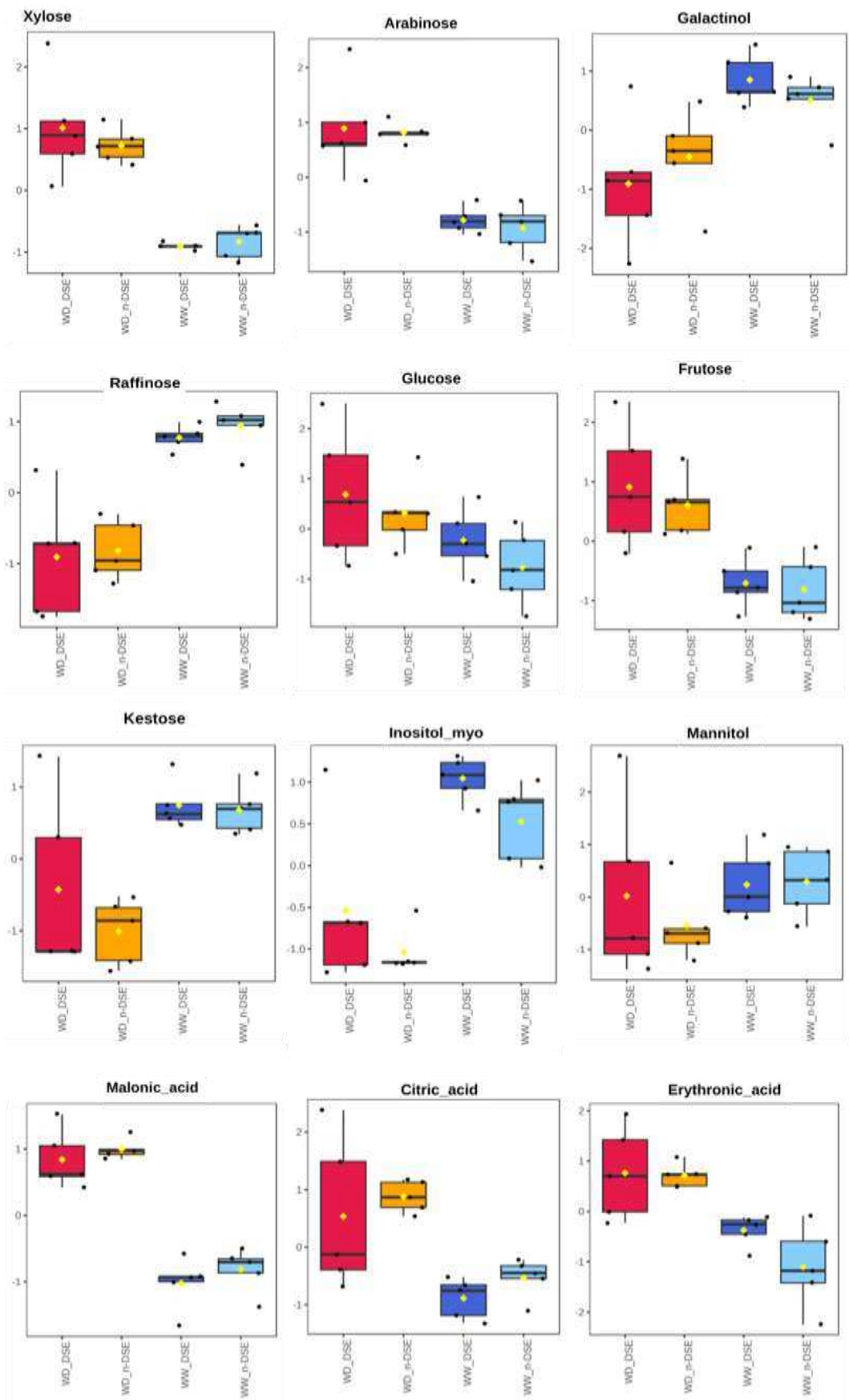
Os metabólitos com maiores valores de VIP foram determinantes para a discriminação entre os tratamentos. Na cultivar PO, kestose, rafinose, myo inositol, galactinol, ácido glucurônico, galactose, turanose, glicina e eritrose representaram maior abundância em WW e menor em WD (Figura 35A). Em contraste, ácido malônico acumulou-se em WD. Na cultivar SI, myo inositol, kestose, galactinol e rafinose foram mais abundantes em WW, enquanto que ácido malônico, ácido eritórico, xilose e arabinose representaram maior acúmulo em WD (Figura 35B).



**Figura 35:** Metabólitos radiculares de feijão-caupi (*V. unguiculata*), das cultivares Pingo De Ouro **A** (tolerante a seca) e Santo Inácio **B** (susceptível a seca), selecionados com base nos escores VIP (Variable Importance in Projection) obtidos a partir do modelo supervisionado de sPLS-DA. O gráfico de loadings (Loadings 1) apresentam a contribuição dos metabólitos mais relevantes para a discriminação entre os grupos experimentais definidos pelas condições hídricas (WW e WD) e pela inoculação com fungos endofíticos melanizados septados (DSE e n-DSE). A direita, os mapas de cores representam o padrão relativo de abundância desses metabólitos entre os tratamentos, onde azul indica menor abundância e o vermelho maior abundância.



**Figura 36.** Distribuição dos níveis de metabólitos radiculares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), da cultivar Pingo De Ouro (tolerante a seca), selecionados com base nos maiores valores absolutos de loading na PC1 da análise de componentes principais (PCA) e nos maiores valores de VIP do modelo sPLS-DA. Os metabólitos ilustram padrões consistentes com o gradiente metabólico identificado nas análises multivariadas. Os gráficos apresentaram, para cada metabólito, os valores após transformação e normalização dos dados, estratificados pelos grupos experimentais WD-DSE, WD, n-DSE, WW-DSE, WW n-DSE. As caixas representam o intervalo interquartil, a linha central indica a mediana e os pontos correspondem às observações individuais (n=5).



**Figura 37.** Distribuição dos níveis de metabólitos radiculares de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), da cultivar Santo Inácio (drought-susceptible), selecionados com base nos maiores valores absolutos de loading na PC1 da análise de componentes principais (PCA) e nos maiores valores de VIP do modelo sPLS-DA. Os metabólitos ilustram padrões consistentes com o gradiente metabólico identificado nas análises multivariadas. Os gráficos apresentaram, para cada metabólito, os valores após transformação e normalização dos dados, estratificados pelos grupos experimentais WD-DSE, WD n-DSE, WW-DSE, WW n-DSE. As caixas representam o intervalo interquartil, a linha central indica a mediana e os pontos correspondem às observações individuais (n=5).

## 7 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstram que os solos da Caatinga constituem uma fonte relevante de fungos endofíticos, conforme evidenciado pela obtenção de 14 isolados que foram capazes de colonizar *V. unguiculata*. Desses isolados, 11 colonizaram raízes de *Zea mays* (Figura 6), indicando que esses fungos também são capazes de colonizar outras culturas agrícolas (Malicka et al., 2022). Estudos sobre a inoculação vegetal com diferentes espécies de DSEs ressaltam que para que haja associação benéfica entre planta-DSE sob déficit hídrico, é necessário que haja compatibilidade entre ambos os organismos (Malicka et al., 2022). Esses fatores podem estar associados à espécie da planta hospedeira, ao estágio vegetativo, à fertilidade do solo, bem como também aos fatores ambientais (Farias et al., 2020, Vidal et al., 2022). A característica endofítica dos DSES não se restringe a culturas como *V. unguiculata* e *Zea mays*, sendo esses fungos capazes de colonizar diferentes espécies vegetais e contribuir para tolerância ao estresse hídrico em diversos sistemas. Diversos autores destacam a capacidade dos DSEs de colonizar diversas outras espécies de plantas, como *Isatis indigotica*, *Lycopersicon esculentum* Mill, *Oryza sativa*, *Glicine max* (Mishra et al., 2024, Berthelot et al., 2016, Farias et al., 2020, Li. et al., 2023, Halo 2020, Santos 2017, Rothen et al., 2017).

No presente estudo, foram observadas estruturas típicas dos DSEs associadas ao córtex das raízes, tais como hifas septadas e melanizadas, microescleródios e clamidósporos (Figura 8). A presença dessas estruturas é uma das principais características morfológicas usadas para identificar a colonização radicular por DSEs. São consideradas estruturas de resistência, associadas à tolerância do fungo a condições adversas, como dessecação, estresse oxidativo e radiação UV, além de funcionarem como possíveis reservatórios de nutrientes (Jumpponen & Trappe, 1998, Redman et al., 2002). A melanina, juntamente com a quitina, também contribui para a rigidez das paredes celulares fúngicas, aumentando a resistência estrutural tanto do fungo quanto, indiretamente, da planta hospedeira (Mandyam & Jumpponen, 2005; Malicka et al., 2022). As hifas penetram os espaços entre células epidérmicas adjacentes, seguem até o eixo principal da raiz e ocupam os espaços intercelulares das células corticais (Currah et al., 1993, Jumpponen & Trappe 1998). A presença das hifas dentro das células da raiz formam massas de células fúngicas pigmentadas compactadas, culminando na formação de microescleródios (Ohki et al., 2002). Uma pesquisa recente (Su et al., 2024) descreve que também foram observados hifas septadas, microescleródios e clamidósporos, em células corticais das raízes de mirtilo colonizadas pelo fungo endofítico DSE R16 (*Dothideomycetes* sp.), que promoveu crescimento e tolerância à seca nesta espécie.

Durante a incubação das cepas, observou-se o crescimento das colônias fúngicas ao longo de sete dias (Figura 7). Esse comportamento pode estar relacionado a fatores como tipo de colônia de fungo, a disponibilidade de nutrientes no meio de cultivo e as condições ambientais fornecidas, incluindo temperatura e umidade, que influenciam diretamente o crescimento microbiano. Esse resultado é consistente a estudos anteriores. Farias et al., (2020), relataram que cepas que apresentam micélio escuro ou marrom, hifas septadas e melanizadas apresentam crescimento ativo em aproximadamente sete dias a 28 °C. De forma complementar, He et al., (2022) destacam que diferentes cepas microbianas podem apresentar padrões distintos de crescimento no meio de cultura, reforçando a influência de fatores intrínsecos e ambientais nesses processo .

Em nossa pesquisa, observou-se que o percentual de colonização radicular pelos DSEs variou entre os isolados e entre os genótipos de *V. unguiculata*. Destaca-se que a cultivar SI descrita como susceptível à seca, apresentou maior taxa de colonização por DSE2 (Figura 16). Esse resultado sugere que genótipos mais suscetíveis ao estresse podem fornecer uma maior colonização pelos DSEs, possivelmente como resposta a condições adversas. Tal interpretação é corroborada por Farias et al., (2020), que relatam a maior taxa de colonização pelo DSE em raízes de cultivares mais susceptíveis só estresse, evidenciando o potencial dos DSEs em ambientes estressantes. Além disso, esse comportamento pode estar associado a influência do genótipo vegetal na formação de estruturas de resistência e no estabelecimento da interação planta-microrganismo.

Nos parâmetros de crescimento, observou-se que o comprimento da raiz, não foi influenciado pela inoculação com a cepa de DSE (Tabela 11). A ausência de resposta pode estar associada baixa eficiência de algumas cepas ou a dependência de condições específicas para a expressão de seus efeitos promotores de crescimento. Em contrapartida, estudos prévios demonstram resultados divergentes, como os reportados por Prema & Muthukumar (2018), nos quais a inoculação com DSE *Nectria haematococca* promoveu aumento significativo no crescimento radicular. De forma semelhante, Li et al., (2019) observaram incrementos expressivos no comprimento das raízes após inoculação com DSE (Pa e Co), evidenciando que a resposta pode variar conforme a interação entre cepa e hospedeiro.

Em relação à biomassa radicular, verificou-se que esta foi influenciada pela inoculação com as cepas de DSEs de forma independente entre si, embora nem todas tenham apresentado efeito significativo. Esse comportamento está em consonância com a literatura, a qual descreve respostas variáveis, incluindo efeitos neutros ou negativos na biomassa de raiz em plantas inoculadas com microrganismo endofíticos (Tabela 6) (Prema & Muthukumar, 2018, Vidal

2022). Adicionalmente, a variabilidade observada pode refletir diversidade adaptativa das cepas frente a condições de estresse, como demonstrado por Li et al., (2019), em que diferentes isolados apresentaram respostas distintas sob simulação de déficit hídrico. De modo geral, a literatura aponta que resposta da biomassa radicular depende tanto do genótipo da planta quanto das características do microrganismo associado (Mandyam; Fox; Jumpponen, 2012, Malicka et al., 2022, Farias et al., 2020).

Para o crescimento da parte aérea e do caule, os resultados indicam que o comprimento do caule foi influenciado principalmente pelas condições hídricas e pelos genótipos, e não pela inoculação com DSE (Figuras 13-18). O estresse hídrico promoveu redução no comprimento do caule em ambas as cultivares, sendo que a cultivar PO apresentou maior crescimento em comparação a SI, independentemente da inoculação. Em contraste com os achados de Da Costa (2023), não foram observadas diferenças entre ambas as cultivares, a ausência de resposta significativa neste estudo pode estar relacionada a intensidade do estresse ou as condições experimentais adotadas.

No que se refere à biomassa da parte aérea, não se observou efeito isolado do genótipo. No entanto, verificou-se interação significativa entre as cepas de DSE e as condições hídricas, sugerindo que a promoção do crescimento é modulada pela disponibilidade de água. Observou-se, ainda, redução na biomassa após a recuperação ao estresse severo, comportamento já descrito para *V. unguiculata*, que apresenta crescimento mais lento após exposição ao déficit hídrico (Agbicodo et al., 2009; Singh & Raja Reddy, 2011; Jayawardhane et al., 2022). Embora a resposta das plantas ao estresse dependa de múltiplos fatores, como genótipo, estado fisiológico e duração do estresse (Adeleke; Babalola, 2022, Dos Santos et al., 2022), os resultados indicam que condições severas podem ultrapassar os limites de tolerância das plantas. Nesse contexto, nem todas as interações entre microrganismos e plantas hospedeiras resultam em benefícios ao crescimento vegetal (Li et al., 2019).

Em condições extremas de déficit hídrico, observou-se que alocação de biomassa foi significativamente alterada, refletida no aumento da R/PA. Neste estudo, essa razão foi maior na cultivar SI (Figura 20), o que pode estar relacionado a maior sensibilidade ao estresse. Esse resultado evidencia uma estratégia adaptativa da parte aérea, visando otimizar a absorção de água em condições limitantes. De acordo com Xu et al., (2015), a alocação preferencial de recursos para o crescimento radicular sob estresse hídrico depende de fatores fisiológicos e ambientais. Embora estudos com *Nectria haematococca* em tomate tenham demonstrado aumento da R/PA em plantas inoculadas (Prema Sundara Valli & Muthukumar, 2018), no

presente estudo não foi observado efeito significativo da inoculação sobre essa variável, sendo esta influenciada predominantemente pelo genótipo. Essa divergência pode estar relacionada as diferenças entre as cepas, a concentração do inóculo ou a complexidade das interações planta microrganismo.

No que se refere ao crescimento da área foliar, observou-se ainda uma interação tripla entre inoculação da cepa de DSE2, genótipo e condição hídrica (Figura 20), indicando que os efeitos dos microrganismos dependem da combinação desses fatores. Além disso, o estresse hídrico promoveu a redução na área foliar, reforçando seu impacto negativo no crescimento vegetal. Resultados semelhantes foram descritos por Basto et al., (2011), que observaram redução de aproximadamente 20% no índice de área foliar sob condições de déficit hídrico. Em conjunto, esses achados indicam que, embora microrganismos possam influenciar o crescimento vegetal, a disponibilidade hídrica e o genótipo da planta são determinantes centrais na modulação dessas respostas.

No que se refere as trocas gasosas, o déficit hídrico promoveu reduções nos parâmetros  $g_s$ , A, E, em ambas as cultivares, independentemente da presença ou ausência de DSE (Figura 21). Esses resultados indicam uma resposta fisiológica típica ao estresse hídrico, na qual o fechamento estomático atua como uma das primeiras estratégias para reduzir a perda de água, conforme descrito na literatura ( Hsu et al., 2021; Saito & Uozumi, 2019; Singh & Raja Reddy, 2011).

No presente estudo, observou-se que a razão  $C_i/C_a$  foi mais reduzida na cultivar SI, sugerindo maior fechamento estomático e, conseqüentemente, menor entrada de  $CO_2$ , entretanto, a interpretação da  $C_i/C_a$  deve considerar que a concentração interna de  $CO_2$  depende tanto da condutância estomática quanto pela taxa de fotossíntese (Zhang et al., 2014). Assim, reduções na fotossíntese podem atenuar a queda de  $C_i/C_a$  ou até leva-la, mesmo sob estresse hídrico. Portanto, a maior redução observada em SI indica predominância de limitação estomática nessa cultivar.

Estudos demonstram que DSE pode regular processos de fisiológicos, como fotossíntese e a respiração em plantas sob condições adversas (Malicka et al., 2022). No presente estudo, a inoculação com a cepa de DSE2 promoveu respostas distintas entre as cultivares. Na cultivar PO, descrita como tolerante ao estresse, observou-se aumento na eficiência intrínseca do uso da água ( $iWUE$ ), passando de uma redução de 62.3% na ausência da inoculação para um incremento de 45.8 % na presença da cepa, indicando efeito positivo da interação. Em contraste,

na cultivar sensível SI, embora tenham sido observadas diferenças entre os tratamentos com inoculação e sem inoculação, estas foram menos expressivas. Esse padrão sugere que a resposta à inoculação com fungo é dependente do genótipo da planta, sendo mais pronunciada em cultivares tolerante ao estresse. Esse comportamento pode estar associado a mecanismos fisiológicos e bioquímicos mediados por microrganismos, incluindo a regulação hormonal. Estudos relatam que a inoculação com DSE pode aumentar o acúmulo de ácido abscísico (ABA) e modular a expressão gênica relacionada ao estresse. Esse resultado corrobora com os achados de (Liu; Wei, 2019; Andrade-Linares et al., 2011). O ABA desempenha papel central na resposta ao déficit hídrico, promovendo fechamento estomático e contribuindo para a regulação osmótica e manutenção do metabolismo vegetal sob estresse (Haghpanah et al., 2024).

Nosso estudo, utilizou-se a técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS), para separar, identificar e quantificar metabólitos presentes em *V. unguiculata* (Chen et al., 2022; Chaudhary; Shukla, 2018., Adeleke; Babalola, 2022). Por meio dessa abordagem, foram identificados açúcares solúveis, álcoois de açúcar (polióis), aminoácidos, ácidos orgânicos (Figuras 25-33).

A análise do perfil metabólico, tanto em folha quanto em raízes, indicou uma reprogramação metabólica associada à proteção celular, ajuste osmótico e manutenção da homeostase (Myers; Kitajima, 2007). Estudos com milho e soja utilizando GC-MS, afirmam que esses metabólitos do metabolismo primário desempenham papel central no crescimento e no desenvolvimento vegetal, além de atuarem como precursores para a síntese de metabólitos secundários (Medeiros et al., 2021; Benkeblia et al., 2007). Sob condições de déficit hídrico, esses metabólitos são diferentemente regulados via metabólicas essenciais, como glicólise, o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), a via das pentoses-fosfato. Essas vias são fundamentais para o fornecimento da energia e para manutenção dos processos fisiológicos, especialmente em condições de estresse (Ferne et al., 2004).

Foram identificados, neste estudo, açúcares como glicose, frutose, maltose e rafinose, álcoois de açúcar como manitol, sorbitol, inositol. Esses compostos desempenham papel fundamental no balanço osmótico e na sinalização do estresse, sendo seu acúmulo um dos principais mecanismos de manutenção da pressão de turgor e da integridade celular sob condições adversas. Dessa forma, permitem o ajuste do potencial osmótico, evitando o murchamento e assegurando a continuidade do crescimento e das funções metabólicas (Ghosh et al., 2021; Sharma et al., 2019; Khan et al., 2018)

A literatura demonstra que o acúmulo de açúcares solúveis é uma resposta recorrente a diferentes tipos de estresse abiótico, incluindo estresse térmico e déficit hídrico (Salas-Pérez et

al., 2018, Pressman et al., 2002, ). Além disso, variações nesses metabólitos podem ocorrer entre genótipos e tecidos vegetais, sendo frequentemente mais acentuadas nas folhas do que na raiz (Silvente et al., 2012., Das et al., 2017.,Shelden et al., 2016).

No presente estudo, embora não tenha sido realizada a quantificação de melanina, é relevante considerar que DSE possuem esse composto, o qual pode atuar como antioxidante em condições de estresse hídrico (Lopez et al., 2024). Associado a isso, os elevados níveis de açúcares solúveis observados nas duas cultivares sob déficit hídrico sugerem a ativação de vias metabólicas relacionadas a defesa celular, como a via das pentoses-fosfato, responsável pela geração de compostos antioxidantes. Esses mecanismos contribuem para a mitigação dos danos oxidativos e para a manutenção da integridade estrutural das células vegetais.

A análise de PCA (Figuras 24-32), foi utilizada para explorar a variação global dos dados metabolômicos em *V. unguiculata*. Essa abordagem permitiu avaliar o grau de similaridade entre os perfis metabólicos, evidenciado que o regime hídrico exerceu forte influência sobre o metabolismo das duas cultivares contrastantes. Além disso, possibilitou identificar alterações no perfil metabólico em folhas e raízes sob condições de déficit hídrico, bem como a influência da inoculação com a cepa de DSE nesse processo. Observou-se que a maioria das amostras submetidas ao mesmo tratamento apresentaram agrupamento distinto, separando-se dos demais, o que indica padrões diferenciados de acúmulo metabólico em resposta às condições avaliadas (Sun et al., 2023).

Estudos recentes, como o de Zou et al. (2023), destacam a eficiência dessa técnica na identificação de padrões de separação entre tratamentos, determinação dos principais fatores responsáveis pela viabilidade e detecção de possíveis outliers. De forma complementar, Xie et al., (2024), ao utilizarem PCA em seu estudo com DSEs, demonstraram relações significativas entre a intensidade da colonização do DSE e o crescimento das vegetal.

Os níveis de piruvato, ácido glicérico, ácido cítrico foram significativamente mais elevados sob condições de irrigação plena em ambas cultivares na folha, com exceção de ácido cítrico na cultivar SI (Figuras 28-29). Em contraste, o déficit hídrico esteve associado à redução desses metabólitos, sugerindo alterações no metabolismo energético e no metabolismo primário. O piruvato e o citrato são intermediários-chaves da via de TCA, e sua redução sob WD indica menor atividade respiratória mitocondrial, típica de plantas sob condições adversas. Além disso, níveis elevados de piruvato tem sido associados a menores concentrações de malondialdeído (MDA), um indicador de estresse oxidativo (Xie et al., 2024), o que pode refletir um metabolismo mais ativo e menor dano celular em condições de irrigação plena.

Das et al (2017) relataram, em estudo de perfil metabólico em soja, que estresse térmico promoveu a redução nas concentrações de metabolitos como maltose, galactinol, manitol e sacarose nas folhas. De forma semelhante, no presente estudo, observou-se redução desses metabolitos sob condições de déficit hídrico. No entanto, essa redução foi mais acentuada nas raízes em comparação às folhas, em ambas cultivares (Figuras:36 -37).

Foram observados níveis elevados de osmoprotetores, como Inositol, Galactinol, Sorbitol e Rafinose (via RFO), sob condições de WD nas folhas de ambas cultivares, com exceção do inositol na cultivar SI (Figuras 28-29). Esse padrão indica a ativação de mecanismos de tolerância a déficit hídrico, associados a proteção celular e a manutenção da homeostase osmótica, sendo esses efeitos mais pronunciado na cultivar tolerante. A literatura destaca que o inositol desempenha um papel preponderante na tradução de sinais sob estresses ambientais, além de atuar no armazenamento e na distribuição de açúcares e na formação da parede celular (Hu et al., 2024). A ausência desse metabolito na cultivar SI pode estar relacionada a diferenças no metabolismo da folha entre as cultivares. Da mesma forma, os polióis são solutos osmoticamente ativos que podem se acumular em altas concentrações nas células vegetais, contribuindo para a manutenção do potencial hídrico (Noiraud., et al 2001).

A rafinose, em particular, desempenha múltiplas funções no metabolismo vegetal, incluindo participação na tolerância ao estresse hídrico, na transdução de sinais e na translocação de fotoassimilados (Salvi et al., 2022). Além disso, evidências indicam que galactinol e rafinose estão associados a capacidade antioxidante, contribuindo para a neutralização de espécies reativas de oxigênio (EROs). Nesse sentido plantas com maiores concentrações desses compostos apresentam maior tolerância ao estresse, como demonstrado em estudos com *Arabidopsis* (Elsayed et al., 2014).

Em raízes, observou-se um padrão distinto, com maiores concentrações de alguns desses metabolitos sob condições de irrigação plena em ambas cultivares (Figuras 36-37). Sob déficit hídrico, foram detectados níveis reduzidos de mio-inositol, galactinol e rafinose, sugerindo comprometimento na síntese de osmoprotetores, possivelmente associado a redução da atividade fotossintética e ao menor fornecimento de fotoassimilados. Esse comportamento é consistente em estudos que demonstram que a redução de mio-Inositol resulta em reduções significativas nos níveis de galactinol e RFOs em plantas, como soja (*Glycine max*) e batata (*Solanum tuberosum*) (Karner et al., 2004). Tais achados indicam que uma resposta órgão-específica, na qual a planta prioriza a proteção das folhas, possivelmente redistribuindo osmoprotetores a partir das raízes. Em condições de irrigação plena, as raízes apresentam

maiores níveis desses compostos, refletindo ausência de necessidade de realocação e a manutenção da homeostase metabólica (Obata; Fernie, 2012).

No presente estudo, observou-se níveis elevados de prolina e glicina sob condições de irrigação, tanto na presença quanto na ausência de inoculação com a cepa (Figura 36). Esse padrão pode estar associado a um metabolismo ativo de nitrogênio e aminoácidos, contribuindo para a síntese proteica e manutenção do crescimento vegetal, típico de plantas metabolicamente ativas (Ashraf et al., 2007 & Kishor et al., 2005). Em contraste, do que foi observado no presente estudo, autores afirmam que a Glicina e prolina sob condições de WD, atuam como osmóticos compatíveis, sendo frequentemente em maiores concentrações como mecanismo de adaptação a seca (Galili, 2011, Zhang et al., 2016; Mwadzingeni et al., 2016; El Moukhtari et al., 2020).

Diferentemente das contribuições observadas para prolina e glicina, verificou-se maior expressão de metabolitos relacionados ao metabolismo de aminoácidos, como valina e glutamina, particularmente nas folhas da cultivar SI sob condições de déficit hídrico (Figura 29). Elevadas concentrações desses aminoácidos estão associadas a mecanismos de defesa vegetal, atuando na neutralização de EROs e quanto na regulação do potencial osmótica (Krasensky & Jonak, 2012). Além disso, esses aminoácidos desempenham papel central no fornecimento de energia, participando de vias metabólicas essenciais, como a glicólise, o ciclo de TCA e o metabolismo dos aminoácidos, contribuindo para a adaptação das plantas ao estresse hídrico.

Em relação aos ácidos orgânicos, ácido cítrico apresentou maior acúmulo nas raízes da cultivar SI sob WD (Figura 37). Em contraste, nas folhas, observou-se maior abundância desse metabolito na cultivar PO sob condições hidratadas (Figura 28), evidenciando respostas metabólicas distintas entre os órgãos e genótipos. Por ser um intermediário do ciclo TCA, o aumento do ácido cítrico na cultivar susceptível indica uma reprogramação metabólica voltada a síntese compostos de defesa sob estresse. Por outro lado, seu aumento em PO sob condições hidratadas está relacionada ao funcionamento normal da via TCA, isto é, mecanismo de adaptação metabólica eficiente, típico de plantas tolerantes sob irrigação. Estudos indicam que níveis elevados de ácido cítrico em estresse hídrico estão associados ao aumento na síntese de metabolitos secundários, como flavonoides, em plantas sob condições adversas (Salas-Pérez et al., 2018).

A análise de sPLS-DA revelou que a maioria dos metabolitos com VIP mais altos, foram produzidos sob condições de estresse hídrico nas folhas de ambas cultivares (Figura 27). Em contraste, nas raízes, ácido malônico destacou-se como o principal metabolito discriminante sob condições de déficit hídrico (Figura 35). Esse padrão pode estar relacionado ao fato de as

folhas serem órgãos mais diretamente afetados pelo déficit hídrico, onde ocorrem intensas alterações metabólicas, incluindo processos oxidativos. Nesse contexto, a sobrevivência das plantas sob déficit hídrico depende, em grande parte, da capacidade de proteger estruturas celulares e manter a homeostase metabólica (Couchoud et al., 2020, Obata; Fernie, 2012)

Sob condições de déficit hídrico, observaram-se níveis elevados de xilose, arabinose, ácido malônico e ácido eritrônico, nas raízes da cultivar SI (Figura 37). De forma semelhante, na cultivar PO o ácido malônico destacou-se como o principal metabolito acumulado nas raízes sob estresse hídrico. Esses resultados indicam uma reprogramação metabólica diferencial entre genótipos, especialmente no sistema radicular da cultivar susceptível, que desempenha papel central na resposta ao estresse evitando maiores danos celulares.

A literatura sugere que o aumento de ácido eritrônico está associado a resposta ao estresse oxidativo, frequentemente, relacionado a elevados níveis de MDA nas células (Xu et al., 2017, Farooq & Wahid; Lee, 2009); Da mesma forma, xilose tem sido aplicada na manutenção da homeostase metabólica celular sob condições de estresse hídrico (Hassan et al., 2024), enquanto arabinose constitui um componente essencial de polissacarídeos da parede celular, glicoproteínas, flavonoides e moléculas sinalizadoras, contribuindo para a integridade estrutural e funcional das células vegetais sob estresse (Rautengarten et al., 2017).

Em relação manitol, composto amplamente distribuído em fungos filamentosos e também presente em plantas. Não foram observadas variações significativas em seus níveis entre os tratamentos, especialmente na cultivar SI. Esse metabolito pode atuar como importante fotoassimilado e fonte de carbono para tecidos não fotossintetizantes, sendo sintetizado em paralelo com a sacarose (Stoop et al., 1996).

Além disso, os elevados níveis de ácido malônico observados nas raízes sob estresse hídrico sugerem um possível papel de modulação metabólica e nas interações com microrganismos. Estudos indicam que esse composto pode atuar como fonte de carbono para o crescimento microbiano e influenciar redes de interação no solo, além de estar associado a inibição da enzima succinato desidrogenase no ciclo TCA, refletindo alterações no metabolismo respiratório (Zhang Shubo et al., 2024).

## 8 CONCLUSÕES

Nos últimos anos, estudos com fungos endofíticos melanizados e septados (DSEs) têm avançado significativamente em diferentes áreas de pesquisa. No presente trabalho, adotou-se uma abordagem exploratória voltada à prospecção e caracterização funcional de DSEs nativos da Caatinga, com objetivo de identificar isolados com potencial de aplicação na agricultura regional, particularmente como agentes promotores de crescimento e mitigadoras dos efeitos do déficit hídrico.

Neste âmbito, conclui-se que em regiões preservadas da Caatinga, no nordeste Semiárido brasileiro, abrigam diferentes cepas de DSEs capazes de colonizar *V. unguiculata* em diferentes cultivares, bem como outras espécies vegetais, como *Zea mays*, evidenciando baixa especificidade de hospedeiro.

A inoculação com diferentes cepas de DSE influenciou significativamente a biomassa radicular e a recuperação das plantas após o estresse hídrico, com efeitos dependentes do regime hídrico e do genótipo. O estresse hídrico severo reduziu a biomassa da parte aérea, porém, a inoculação atenuou esse efeito, com destaque para as cepas DSE2 e DSE4, que proporcionaram melhor desempenho na recuperação pós-estresse e menor impacto visual, especialmente na cultivar susceptível. A cepa DSE2 destacou seu desempenho sob diferentes níveis de estresse hídrico, por manter a produção da biomassa da parte aérea mais consistente sob condições de estresse moderado e severo, indicando elevado potencial para mitigação dos efeitos do déficit hídrico.

A inoculação com a cepa DSE2 não influenciou o comprimento da raiz nem da parte aérea sob estresse, contudo, a área foliar foi significativamente influenciada pela interação entre DSE2, regime hídrico e pelo genótipo, com atenuação da redução foliar na cultivar SI. A colonização radicular foi igualmente dependente desses fatores, sendo mais elevada na cultivar susceptível sob déficit hídrico.

Em relação às trocas gasosas, o déficit hídrico promoveu redução nos parâmetros avaliados em ambas cultivares, com exceção da eficiência intrínseca do uso da água (iWUE) na cultivar PO. A inoculação com a cepa DSE2 resultou em aumento do iWUE em ambos genótipos, sendo esse efeito mais pronunciado na cultivar PO, indicando papel relevante da cepa na modulação da eficiência fisiológica sob condições de estresse hídrico.

No nível metabólico, o regime hídrico foi o principal fator responsável pelas alterações no metabolismo foliar e radicular. A inoculação com a cepa de DSE2 exerceu efeito secundário na modulação metabólica, com efeitos dependentes do genótipo e do órgão analisado. No entanto, na cultivar SI, foram observadas alterações mais expressivas no metaboloma radicular na

presença da DSE2, indicando uma reprogramação metabólica mais estruturada em resposta ao déficit hídrico.

De modo geral, as cultivares apresentam estratégias distintas de adaptação ao estresse hídrico, sendo que a cultivar tolerante (PO) exibiu maior estabilidade metabólica na folha, enquanto a cultivar susceptível (SI) demonstrou maior plasticidade metabólica na raiz, possivelmente associada a uma maior dependência da interação com microrganismos. Desta forma, os resultados obtidos reforçam o papel de DSEs como importantes agentes na modulação de respostas fisiológicas e metabólicas em plantas sob estresse hídrico, evidenciando seu potencial para aplicação em sistemas agrícolas mais resilientes e sustentáveis.

Por fim, recomenda-se a realização de estudos futuros que investiguem a capacidade dessas cepas na produção de compostos como ABA e melanina, bem como análises moleculares para caracterização genética dos isolados e elucidação dos mecanismos envolvidos na promoção do crescimento vegetal.

## REFERÊNCIAS

- ADELEKE, Bartholomew Saanu.; BABALOLA, Olubukola Oluranti. Meta-omics of endophytic microbes in agricultural biotechnology. **Biocatalysis and Agricultural Bitechology**, [s. l.], v. 42, n. 3, p. 102-332, 2022.
- ALVALÁ, Regina C.S.; CUNHA, Ana Paula M. A.; BRITO, Sheila Sheila S.B.; Marcelo E.; MARENGO, José A.; MORAES, Osvaldo L.L.; CARVALHO, Magog A. Drought monitoring in the Brazilian Semiarid region. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s. l.], v. 91, supl.1, e20170209, 2019.
- ASHRAF, M. M.R.; FOOLAD. M. R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stree resistance. **Environmental and Experimental Botany**, [s. l.], v. 59, n. 2, p. 206-216, 2007.
- BASTOS, E. A.; NASCIMENTO, S. P.; SILVA, E. M.; FREIRE FILHO, F. R.; GOMIDE, R. L. Identification of cowpea genotypes for drought tolerance. Identification of cowpea genotypes for drought tolerance. **Agronomic Science Journal**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 100-107, 2011.
- AGBICODO, E. M. *et al.* Breeding drought tolerant cowpea: constraints, accomplishments, and future prospects. **Euphytica**, [s. l.], v. 167, n. 3, p. 353–370, 2009.
- ALAM, Beena *et al.* Endophytic Fungi: From Symbiosis to Secondary Metabolite Communications or Vice Versa? **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 12, p. 791-033, 2021.
- ANDRADE-LINARES, Diana Rocio *et al.* Effects of dark septate endophytes on tomato plant performance. **Mycorrhiza**, [s. l.], v. 21, n. 5, p. 413–422. 2011.
- BENKEBLIA, Nouredddine.; SHINANO, Takuro.; OSAKI, Mitsuru. Metabolite profiling and assessment of metabolome compartmentation of soybean leaves using on-aqueous fractionation and GC-MS analysis. **Metabolomics**, [s. l.], v. 3, n. 3; p. 297-305, 2007.
- BERTHELOT, Charlotte *et al.* Plant growth promotion, metabolite production and metal tolerance of dark septate endophytes isolated from metal-polluted poplar phytomanagement sites. **FEMS Microbiology Ecology**, [s. l.], v. 92, n. 10, 2016.
- BONFIM, Joyce Andrade *et al.* Dark septate endophytic fungi of native plants along an altitudinal gradient in the Brazilian Atlantic Forest. **Fungal Ecology**, [s. l.], v. 20, p. 202-210. 2016.
- BURITI, C; BARBOSA, H.A, PAREDES, F.J. *et al.* A Century of droughts: Why water policies Didnt develop Brazil s semi-arid region. **Revista. Brasileira de Meteorologia**, [s. l.], v. 35, p. 683-688, 2020.
- CARVALHO, M. *et al.* Evaluatin stress responses in cowpea under drought stress. **Journal of Plant Physiology**, [s. l.], v. 241, 2019.
- COHAVI, A.; RACHMILEVITCH, S. G.; BEL, S. Effect of irrigation regimes on the development dynamics of the plum (*Prunus cerasifera*) root system. **Plant Biosystem**, [s. l.], v.153, p. 529-537, 2019.

CHAUDHARY, Twinkle.; SHUKLA, Pratyosh. Bioinoculant capability enhancement through metabolomics and systems biology approaches. **Briefings in Functional Genomics**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 159–168, 2018.

CHEN, Xue-liang *et al.* Transcriptomic and Metabolomic Approaches Deepen Our Knowledge of Plant–Endophyte Interactions. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 12, p.700200, 2022.

CURRAH, R. S.; TSUNEDA, A.; MURAKAMI, S. Morphology and ecology of *Phialocephala fortinii* in roots of *Rhododendron brachycarpum*. **Canadian Journal of Botany**, [s. l.], v. 71, n. 12, p. 1639–1644, 1993.

DAS, Aayudh.; RUSHTON, Paul J.; ROHILA, Jai S. Metabolomic Profiling of Soybeans (*Glycine max* L.) Reveals the Importance of Sugar and Nitrogen Metabolism under Drought and Heat Stress. **Plants**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 21, 2017.

DA COSTA, Ana Carolin. **Physiological and molecular analysis of suberin deposition in stem roots of contrastant genotypes of *Vigna unguiculata* [L] Walp. During water deficit**. 2023. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2023.

DELATTRE, Cédric *et al.* Production of fungal biopolymers and their advanced applications. In: TAHERZADEH, Mohammad J., FERREIRA, Jorge A.; PANDEY, Ashok (ed.). Current Development in biotechnology and bioengineering: Filamentous Fungi Biorefinery. **Amsterdam Elsevier**, [s. l.], p. 497-532, 2023.

ELSAYED, A. I.; RAFUDEEN, M. S.; GOLLDACK, D. Physiological aspects of raffinose family oligosaccharides in plants: protection against abiotic stress. **Plant Biology**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 1–8, 2014.

EI MOUKHTARI, A.; CABASSA-HOURTON, C.; FARISSI, M.; SAVOURÉ, A. How does proline treatment promote salt stress tolerance during crop plant development? **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 11, p. 1127, 2020.

EMBRAPA. Application of low-cost irrigation technologies in agricultural areas cultivated during prolonged periods of drought: **Brasil/Africa partnership**. **Brasília, DF**: Embrapa, 2016. Disponível em: Portal Embrapa Acesso em 31 fevereiro 2026

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Articulação Semiárido brasileiro**. IBGE, 2021.

FARIAS, Gabriel Castro *et al.* Dark septate endophytic fungi mitigate the effects of salt stress on cowpea plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 243–253, 2020.

FAROOQ, Muhammad; WAHID, Abdul; LEE, Dong-Jin. Exogenously applied polyamines increase drought tolerance of rice by improving leaf water status, photosynthesis and membrane properties. **Acta Physiologiae Plantarum**, [s. l.], v. 31, n. 5, p. 937–945, 2009.

FERNIE, Alisdair R.; CARRARI, Fernando.; SWEETLOVE, Lee J. Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. **Current Opinion in Plant Biology**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 254–261, 2004.

FAO, IFAD, UNICEF, WFP. The state of food security and nutrition in the World 2017: building resilience for peace and food security. **Rome: FAO**, 2017, 144 p. Disponível em: <https://www.fao.org/3/17695e.pdf>. Acesso em 19 Maio 2026

FERNIE, Alisdair R.; CARRARI, Fernando.; SWEETLOVE, Lee J. Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. **Current Opinion in Plant Biology**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 254–261, 2004.

FITZPATRICK, C. R.; MUSTAFA, Z. VILIUNAS, Z. Soil microbes alter plant fitness under competition and drought. **Journal of Evolutionary Biology**, [s. l.], v. 32, n. 5, p. 438-450, 2019.

FUJIMORI, Shinichiro *et al.* A multi-model assessment of food security implications of climate change mitigation. **Nature Sustainability**, [s. l.], v. 2, n. 5, p. 386–396, 2019.

GALILI, Gad. The aspartate-family pathway of plants: linking production of essential amino acids with energy and stress regulation. **Plant Signaling & Behavior**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 192–195, 2011.

GIOVANNTTI, M.; MOSSE B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal in root. **New Phytologist**, [s. l.], v. 84, n. 3, p. 489-500, 1980.

GHOSH, U.K. *et al.* Understanding the roles of Osmolytes for acclimatizing plants to changing environment: a review of potential mechanism. **Plant Signaling & Behavior**, [s. l.], v. 16, n. 8, p. 1913396, 2021.

HALO, Boshra A. An endophytic *Talaromyces omanensis* improves the reproductive, physiological and anatomical characteristics of drought-stressed tomato plants. **Journal of plant Physiology**, [s. l.], v. 249, p.153-137, 2020.

HAGHPANAH, M.; HASHEMI-PETROUNDI, S.; ARZANI, Araniti. F. Drought tolerance in plants: Physiological and Molecular Responses. **Plants**, [s. l.], v.13, n. 2, p. 2962, 2024.

HASANUZZAMAN M. *et al.* Coordinated Actions of Glyoxalase and antioxidant defense systems in conferring abiotic Stress tolerance in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 18, n.7, p. 1423, 2017.

HE, Chao *et al.* Effects of Dark Septate Endophytes on the Performance and Soil Microbia of *Lycium ruthenicum* Under Drought Stress. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 13, p. 884321, 2022.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soil. **Berkeley: University of California**, 1950.

HUANG, J.; YU, H.; GUAN, Wang G.; GUO, R. Accelerated expansion of drylands under climate change. **Nature. Climate. Change**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. 166-172, 2016.

HUERTAS, V.; JIMÉNEZ, A. *et al.* Importance of dark septate endophytes in agriculture in the face of climate change. **Plants**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 1045, 2024.

HSU, Po-Kai *et al.* Signaling mechanisms in abscisic acid-mediated stomatal closure. **The Plant Journal**, [s. l.], v. 105, n. 2, p. 307–321, 2021.

JAYAWARDHANE, Jayamini *et al.* the response of cowpea (*Vigna unguiculata*) Plants to three abiotic stresses applied with increasing intensity: hypoxia, salinity, and water deficit. **Metabolites**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 48, 2022.

JUMPPONEN, Ari.; TRAPPE James M. Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. **New Phytologist**, [s. l.], v. 140, n. 2, p. 295-310, 1998.

KARNER, Ute *et al.* myo-Inositol and sucrose concentrations affect the accumulation of raffinose family oligosaccharides in seeds. **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], v. 55, n. 405, p. 1981–1987, 2004.

KISHOR, P. B. Kavi *et al.* Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. **Current Science**, [s. l.], v. 88, n. 3, p. 424–438, 2005.

KHAN, A; PAN, X.; NJEEB, U. *et al.* Coping with drought: stress and Adaptive mechanisms, and management through cultural and molecular alternatives in cotton as vital constituents for plants stress resilience and fitness. **Biological. Research**. [s. l.], v. 51. p. 47, 2018.

KRASENSKY, Julia.; JONAK, Claudia. Drought salt and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. **Journal of Experimental botany**, [s. l.], v. 63, n. 4, p. 1593-1608, 2012.

KOPKA, J.; SCHAUER, N.; KRUEGER, S.; BIRKENMEIER, J.; USADEL, B.; BERGMULLER, E.; DORMANN, P.; WECKWERTH.W.; GIBON, Y.; Stitt, M; WILLMITZER, L.; FERNIE, A.R; STEINHAUSER, D.GMD@CSB.DB: the Golm Metabolome Database. **Bioinformatics**, [ s. l.], v. 21, n. 8, p. 1635-1638, 2005.

KUMAR, A.; SHARMA, S.; CHAUDHURI, V.; MALHOTRA, K.; KAPOOR, P.; RAUL, J. Genome–Wide Identification and characterization of heat shock protein family reveals role in development and stress conditions in *Triticum aestivum* L. **Scientific Reports**. [s. l.], v.10, n.1, p.7858, 2019.

LATA R. *et al.* Induction of abiotic stress tolerance in plants by endophytic microbes. **Letters in Applied Microbiology**, [s. l.], v. 66, n. 4, p. 268-278, 2018.

LI, Xia *et al.* Dark septate endophytes improve the growth of host and non-host plants under drought stress through altered root development. **Plant and Soil**, [s. l.], v. 439, n. 1, p. 259–272, 2019.

LIU, Z.; ZHANG, M.; CHEN, P.; HARNLY, J. Mass spectrometry based nontargeted and targeted analytical approaches in fingerprinting and metabolomics of food and agricultural research. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v.70, n. 45, p. 14138-14157, 2022.

- LIU, Yan.; WEI, Xiaoli. Dark septate endophyte improves drought tolerance of *Ormosia hosiei* Hemsley & E. H. Wilson by modulating root morphology, ultrastructure, and the ratio of root hormones. **Forests**, [s. l.], v. 10, n. 10, p. 913, 2019.
- LOPEZ, Roberto Oscar *et al.* Towards a better understanding of melanins from dark septate endophytes (DSEs): their variability, synthesis pathways and biological roles. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 1650–1664, 2024b.
- MANDYAM, Keerthi.; JUMPPONEN, Ari. Seeking the elusive function of the root colonizing dark septate endophytic fungi. Studies in. **Mycology**, [s. l.], v. 53, p.173-189, 2005.
- MALICKA, Monika.; MAGURNO, Franco.; PIOTROWSKA-SEGET, Zofia. Plant association with dark septate endophytes: When the going gets tough (and stressful), the tough fungi get going. **Chemosphere**, [s. l.], v. 302, p. 134830, 2022.
- MANDYAM, Keerthi.; FOX, Chad.; JUMPPONEN, Ari. Septate endophyte colonization and host responses of grasses and forbs native to a tallgrass prairie. **Mycorrhiza**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 109–119, 2012.
- MEDEIROS, David B.; BROTMAN, Yariv.; FERNIE, Alisdair R. The utility of metabolomics as a tool to inform maize biology. **Plant Communications**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 100187, 2021.
- MISHRA, Sunishtha *et al.* An overview of symbiotic and pathogenic interactions at the fungi-plant interface under environmental constraints. **Frontiers in Fungal Biology**, [s. l.], v. 5, p. 1363460, 2024.
- MWADRINGENI, L.; SHIMELIS, H.; TESFAY, S.; TSILO, TJ. Screening of bread wheat genotypes for drought tolerance using phenotypic and proline analyses. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 7, p.1276, 2016.
- MYERS, Jonathan A.; KITAJIMA, Kaoru. Carbohydrate storage enhances seedling shade and stress tolerance in a neotropical forest. **Journal of Ecology**, [s. l.], v. 95, n. 2, p. 383–395, 2007.
- MULLER, Caroline.; DOS AJOS Leticia.; FREIRE, Francisco.; FERNIE, Alisdair.; DALOSO, Danilo.; ELLER, Cleiton.; MERCHANT, Andrew. Metabolic network plasticity underpins *Eucalyptus* water use efficiency under drought. **Environmental and Experimental Botany**. [s. l.], p. 106127, 2025
- NOIRAUD, Nathalie.; MAUROUSSET, Laurence.; LEMOINE, Rémi. Transport of polyols in higher plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 39, n. 9, p. 717–728, 2001.
- OBATA, Toshihiro.; FERNIE, Alisdair R. The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 69, n. 19, p. 3225–3243, 2012.
- OGUZ, Muhammet Cagri *et al.* Drought Stress Tolerance in Plants: Interplay of Molecular, Biochemical and Physiological Responses in Important Development Stages. **Physiologia**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 180–197, 2022.

OHKI, Takehiro *et al.* Colonization process of the root endophytic fungus *Heteroconium chaetospora* in roots of Chinese cabbage. **Mycoscience**, [s. l.], v. 43, n. 2, p. 191–194, 2002.

PRESSMAN, Etan.; PEET, MARY M.; PHARR, D. Mason. The effect of heat stress on tomato pollen characteristics is associated with changes in carbohydrate concentration in the developing anthers. **Annals of Botany**, [s. l.], v. 90, n. 5, p. 631–636, 2002.

RAUTENGARTEN, Carsten *et al.* The elaborate route for UDP-arabinose delivery into the Golgi of plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 114, n. 16, p. 4261–4266, 2017.

REDMAN, R.S.; SHEEHAN, K. B.; STOUT, R.G.; RODRIGUES, R. J.; HENSON, J. M. Thermotolerance conferred to plant host and fungal endophyte during mutualistic symbiosis. **Science**, [s. l.], v. 298, n. 5598, p. 1581–1583, 2002

RIVAS.R; FALCAO S.M; RIBEIRO R.V. *et al.*, Drought tolerance in cowpea species is driven by the lower sensitivity of leaf gas exchange of water deficit and the rapid recovery of photosynthesis after rehydration. **South African Journal of Botany's**. [s. l.], v. 103, n. 1, p. 101–107. 2016,

ROTHEN, C. *et al.* Characterization of dark septate endophyte fungi associated with cultivated soybean at two growth stages. **Applied Soil Ecology**, [s. l.], v. 120, p. 62–69, 2017.

RODRIGUES, E.V. Selection of cowpea populations tolerant to water deficit by selection. **2017. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza, CE 2017

SAITO, Shunya.; UOZUMI, Nobuyuki. Guard cell membrane anion transport systems and their regulatory components: an elaborate mechanism controlling stress-induced stomatal closure. **Plants**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 9, 2019.

SALAS-PÉREZ, Lilia *et al.* La aplicación de ácido cítrico incrementa la calidad y capacidad antioxidante de germinados de lenteja. **Revista mexicana de ciencias agrícolas**, [s. l.], v. 9, n. SPE20, p. 4301–4309, 2018.

SALVI, Prafull.; VARSHNEY, Vishal.; MAJEE, Manoj. Raffinose family oligosaccharides (RFOs): role in seed vigor and longevity. **Bioscience Reports**, [s. l.], v. 42, n. 10, p. BSR20220198, 2022.

SANTOS, Mila *et al.* Advances in the role of dark septate endophytes in the plant resistance to abiotic and biotic stress. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 7, n. 11, p. 939, 2007

SHARKEY, T. D.; BERNACCHI, C. J.; FARQUHAR, G. D.; SINGSAAS, E.L. Fitting photosynthetic CO<sub>2</sub> response curves for C<sub>3</sub> leaves. **Plant, Cell & Environment**. [s. l.], v. 30, n. 9, p. 1035–1040, 2007

SANTOS, S. Gomes *et al.* Dark septate endophyte decreases stress on rice plants. **Brazilian Journal of Microbiology** [s. l.], v. 48, n. 2, p. 333–341, 2017.

- SHARMA, A.; Shahzad, B.; Kumar, V. *et al.* Phytohormones regulate Accumulation of Osmolytes Under Abiotic Stress. **Biomolecules**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. 285, 2019.
- SHARKEY, T. D.; BERNACCHI, C. J.; FARQUHAR, G.D; SINGGSAAS, E.L. Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C3 leaves. **Pant, Cell & Environment**, [s. l.], v. 30, n. 9, p. 1035-1040, 2007.
- SEIGERMAN, Sydney K.; LEITE, Nicoly Santos.; MARTINS, Eduardo Sávio P. R.; Donald R. At the extremes: assessing interrelations among the impacts of and responses to extreme hydroclimatic events in Ceará, Northeast Brazil. **Journal of Hydrology**, [s. l.], v. 623, p.130850, 2024.
- HELDEN, Megan C. *et al.* Root spatial metabolite profiling of two genotypes of barley (*Hordeum vulgare* L.) reveals differences in response to short-term salt stress. **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], v. 67, n. 12, p. 3731–3745, 2016.
- SILVENTE, Sonia.; SOBOLEV, Anatoly P.; LARA, Miguel. Metabolite adjustments in drought tolerant and sensitive soybean genotypes in response to water stress. **PloS One**, [s. l.], v. 7, n. 6, p. e38554, 2012.
- SINGH, Shardendu K.; REDDY, K. Raja. Regulation of photosynthesis, fluorescence, stomatal conductance and water use efficiency cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) under drought. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [s. l.], v. 105, n. 1, p. 40–50, 2011.
- STOOP, Johan M. H.; WILLIAMSON, John D.; PHARR, D. Mason. Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. **Trends in Plant Science**, [s. l.], v. 1, n. 5, p. 139–144, 1996.
- SU, Hongyan *et al.* A novel growth-promoting dark septate endophytic fungus improved drought tolerance in blueberries by modulating phytohormones and non-structural carbohydrates. **Frontiers in plant Science**, [s. l.], v. 44, n. 9, p. tpae 105, 2023.
- TELLENBACH, Christoph *et al.* Inhibition of Phytophthora species by secondary metabolites produced by the dark septate endophyte *Phialocephala europaea*. **Fungal Ecology**. [s. l.], v. 6, n. 1, p. 12-18, 2013.
- VALLIYODAN, Babu.; NGUYEN, H. T. Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 189–195, 2006.
- VERGARA, Carlos. *et al.* Contribution of dark septate fungi to the nutrient uptake and growth of rice plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 67-78, 2018.
- VIDAL, C.; GONZÁLEZ, F.; SANTANDER, C. *et al.* Management of rhizosphere microbiota and plant production under drought stress: a comprehensive Review. **Plants** 2022, [s. l.], v. 11, n. 18, p. 2437. 2022.
- Xia, J.; WISHART, D. S. Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using metaboanalyst. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. 743-760, 2011.

XIE, Yali *et al.* Characterization of Dark Septate Endophytes Under Drought and Rehydration and Their Compensatory Mechanisms in *Astragalus membranaceus*. **Microorganisms**, [s. l.], v. 12, n. 11, p. 969, 2024.

XU, Le *et al.* *Piriformospora indica* confers tolerance in *Zea mays* L. through enhanced antioxidant activity and expression of drought-related genes. **The Crop Journal**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 251–258, 2017.

XU, Wei *et al.* Drought stress condition increases root to shoot ratio via alteration of carbohydrate partitioning and enzymatic activity in rice seedlings. **Acta Physiologiae Plantarum**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 9, 2015.

ZOU, Ying-Ning *et al.* Metabolomics reveals arbuscular mycorrhizal fungi-mediated tolerance of walnut to soil drought. **BMC Plant Biology**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 118, 2023.

ZUUR, Alain F.; IENO, Elena N.; SMITH, Graham M. Limitations of linear Regression applied on ecological data. *Statistics for biology and Health. Mixe effects models and extensions in ecology with R*. **New York: Springer**, 2009. p. 11-33

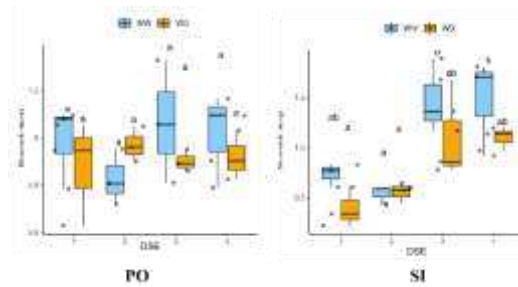
ZHANG, Jing *et al.* Metabolic profiles reveal changes in wild and cultivated soybean seedling leaves under salt stress. **PLoS One**, [s. l.], v. 11, n. 7, p. e0159622, 2016.

ZHANG, S.; GAO, W.; XIE, L.; ZHANG, G.; WEI, Z.; LI, J.; SONG, C.; CHANG, M. Malonic acid shapes bacterial community dynamics in compost to promote carbon sequestration and humic substance synthesis. **Chemosphere**, [s. l.], v. 350, p. 141092, 2024

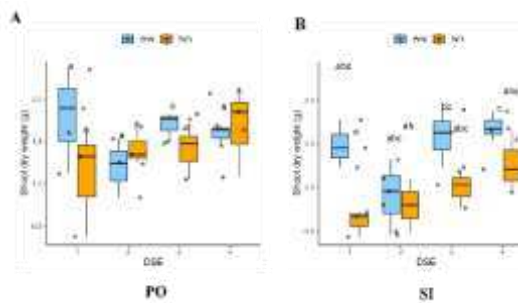
ZHANG, Y.; XU, J.; RIERA, N.; JIN, T.; LI, J.; WANG, N. Huanglongbing impairs the relationship between leaf gas exchange and carbohydrate metabolism in citrus leaves. **Tree Physiology**, [s. l.], v. 34, n. 9, p. 947-95, 2014.

## APÊNDICE A - GRÁFICOS SUPLEMENTARES DA ETAPA 4

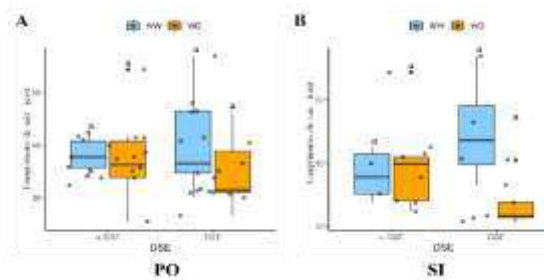
1. Biomassa da raiz das quatro cepas de DSEs diferentes em plantas de *V. unguiculata*



2. Biomassa da parte aérea, das quatro cepas de DSEs em plantas de *V. unguiculata*



3. Comprimento da raiz de plantas de *V. unguiculata* colonizadas com cepa de DSEs2



4. Área foliar de plantas de *V. unguiculata* colonizadas com cepa de DSE2

