



JEAN PAULO VITOR DE OLIVEIRA

**LEAF ANATOMY AND GAS EXCHANGE IN MAIZE AND
SORGHUM AS RELATED TO REDUCED WATER
AVAILABILITY**

**LAVRAS – MG
2021**

JEAN PAULO VITOR DE OLIVEIRA

**LEAF ANATOMY AND GAS EXCHANGE IN MAIZE AND SORGHUM AS
RELATED TO REDUCED WATER AVAILABILITY**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, área de concentração em Botânica Aplicada, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Fabricio José Pereira
Orientador

**LAVRAS – MG
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Oliveira, Jean Paulo Vitor de.

Leaf anatomy and gas exchange in maize and sorghum as
related to reduced water availability / Jean Paulo Vitor de Oliveira.
- 2021.

85 p.

Orientador(a): Fabrício José Pereira.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Water stress. 2. Water use efficiency. 3. Leaf intercellular
spaces. I. Pereira, Fabricio José. II. Título.

JEAN PAULO VITOR DE OLIVEIRA

**ANATOMIA E TROCAS GASOSAS FOLIARES EM MILHO E SORGO
RELACIONADAS À REDUÇÃO DA DISPONIBILIDADE DE ÁGUA**

**LEAF ANATOMY AND GAS EXCHANGE IN MAIZE AND SORGHUM AS
RELATED TO REDUCED WATER AVAILABILITY**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, área de concentração em Botânica Aplicada, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 15 de Abril de 2021.

Dr. Vinícius Politi Duarte UNIFEI
Dr. Thiago Alves Magalhães UFLA

Prof. Dr. Fabricio José Pereira
Orientador

**LAVRAS – MG
2021**

*Primeiramente, a Deus, pois sem ele não estaria aqui.
Aos meus Pais, Jose Maria de Oliveira e Rosilane Aparecida de Carvalho Oliveira, por
sempre me incentivarem e acreditarem em mim mesmo em momentos difíceis.*

A minha filha, Melissa Rezende Oliveira e a todos da minha família.

A todos meus amigos que me ajudaram e me apoiaram.

*Aos meus amigos, discentes e docentes, pertencentes ao laboratório de Anatomia Vegetal do
Departamento de Biologia pelo apoio nas pesquisas e pelas horas de conversas. Ao técnico
do laboratório, Ítalo Antônio Fernandes, pela paciência e pelos ensinamentos dos
procedimentos laboratoriais.*

*Ao Felipe Fogaroli Corrêa, Evaristo Mauro de Castro, Marcio Paulo Pereira, Thiago Alves
Magalhães, Vinícius Politi Duarte e Manuel Losada Gavilanes por estarem ao meu lado
sempre me aconselhando.*

*Ao meu orientador, Fabricio José Pereira, pela paciência, pela amizade e por me ensinar que
na vida apenas conseguimos os nossos sonhos com esforço, disciplina e dedicação.*

“Entregue o seu caminho ao Senhor; confie nele, e ele agirá” (Salmos 37:5).

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, por me guiar ao longo de minha vida e proporcionar mais uma graça alcançada. Sempre me dando força, persistência e coragem para enfrentar os obstáculos da vida.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Biologia e ao Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada pelo auxílio e oportunidade para a realização das pesquisas e da minha formação profissional.

Aos laboratórios de Anatomia Vegetal, Citogenética Molecular e Ecofisiologia de Plantas do Departamento de Biologia – UFLA.

A todos os meus colegas que, de certa forma, contribuíram para a realização desse trabalho.

Aos demais professores e técnicos administrativos pela orientação e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Fabricio José Pereira pela orientação, amparo, confiança, amizade e pelos ensinamentos fundamentais para minha formação.

Aos professores Evaristo, Thiago e Manuel Losada pelo apoio e pelas contribuições para a minha formação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior – Brasil (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos e pelo auxílio no desenvolvimento do projeto.

Na história da humanidade aqueles que aprenderam a colaborar e improvisar foram os que prevaleceram.

Charles Darwin

RESUMO

As mudanças climáticas estão alterando os climas locais e favorecendo a ocorrência de secas em vários ambientes. O milho é frequentemente reconhecido como sensível à seca enquanto que o sorgo é uma espécie considerada tolerante à seca. Esses comportamentos podem estar relacionados com suas características anatômicas e fisiológicas. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do déficit hídrico na anatomia e nas trocas gasosas foliares relacionadas ao crescimento que atribuem características específicas de tolerância à seca em plantas de sorgo e milho. As plantas foram obtidas a partir de sementes e os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação a 25 ± 2 °C. As plantas foram submetidas a três condições de água: capacidade de campo (CC), 75% CC e 50% CC e dez repetições por 60 dias. Foram realizadas análises de crescimento, trocas gasosas e análise quantitativa anatômica. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott com $P < 0,05$. As plantas de sorgo não apresentaram modificações no crescimento ou no conteúdo de água em níveis mais baixos de água, mas foi observado aumento da concentração de carbono intercelular. Além disso, o sorgo apresentou aumento da área do mesofilo e maior proporção de câmaras subestomáticas em níveis de água mais baixos. A limitação de água mudou a anatomia foliar do sorgo incluindo as características estomáticas. O aumento das câmaras subestomáticas no sorgo proporcionou condições para maior absorção de CO_2 bem como a manutenção do crescimento e do conteúdo de água, visto que o aumento das câmaras subestomáticas pode estar relacionado com a tolerância à seca nesta espécie. Para as plantas de milho, a limitação de água causou redução significativa no crescimento, pois a massa seca e outros parâmetros biométricos foram prejudicados. A limitação hídrica reduziu o número de folhas, a largura foliar, a espessura foliar, a área foliar e a área de mesofilo das plantas de milho. Não foram encontradas modificações nas trocas gasosas por unidade de área, mas esses parâmetros foram reduzidos na planta inteira. As plantas de milho mostraram menor retenção de água e aumento da transpiração em condições de limitação hídrica. As modificações anatômicas da folha do milho em condições de limitação hídrica indicam a sua incapacidade de ajustar a anatomia para aumentar a tolerância à seca, mas as plantas foram capazes de sobreviver mesmo com uma limitação de crescimento. Portanto, os espaços intercelulares foliares parecem ser importantes para a tolerância à seca do sorgo, uma vez que essas plantas mostraram a capacidade de alterar esses parâmetros, principalmente o tamanho das câmaras subestomáticas, enquanto que o milho, sensível à seca, não foi capaz de promover mudanças significativas em sua anatomia foliar para melhorar as respostas de tolerância à seca.

Palavras-chave: Estresse hídrico. Poaceae. Metabolismo do tipo C_4 . Eficiência no uso da água. Espaços intercelulares foliares.

ABSTRACT

Climate changes are changing local climates and favoring drought events on several environments. Maize is often recognized as drought-sensitive while sorghum is a recognized drought-tolerant species and these behaviors may be related to anatomical and physiological traits. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of water deficit in the leaf anatomy and gas exchanges as related to growth that attribute specific drought-tolerance traits in sorghum and maize. Plants were obtained from seeds and experiments were conducted in a greenhouse at $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, in which plants were subjected to three water conditions: field capacity (FC), 75% FC and 50% FC and ten replicates for 60 days. Growth, gas exchange, and anatomical analysis were performed. Data were subjected to analysis of variance and means compared by the Scott-Knott test at $P < 0.05$. Sorghum plants showed no growth or water content limitation under lower water levels but increased intercellular CO_2 content was observed. In addition, sorghum showed higher mesophyll area and increased proportion of stomatal cavities under lower water levels. Water limitation rather changed leaf anatomy, including stomatal traits in sorghum plants. Increased stomatal cavities in sorghum grown under water limitation provided conditions for CO_2 uptake and the maintenance of growth and water content as increased stomatal chambers may be related to drought-tolerance in this species. Maize plants showed significant growth reduction under water limitation as the dry mass and other biometrical parameter were harmed. Water limitation reduced the number leaves, leaf width, leaf thickness, leaf area and mesophyll area of maize plants. No modifications were found in the gas exchange per unit area but these parameters were reduced in the whole plant level. Maize plants showed lower water retention and increased transpiration under water-limited conditions. Maize leaf anatomical modifications under water limitation indicate its incapacity to adjust anatomy to enhance drought-tolerance but were still able to survive under a high growth limitation. Therefore, the leaf intercellular spaces seems to be important for sorghum drought tolerance since these plants showed capacity to change these parameters, particularly the stomatal cavities size, while the drought sensitive maize were unable to promote significant changes in its leaf anatomy to improve drought-tolerance responses.

Keywords: Water stress. Poaceae. C_4 metabolism. Water use efficiency. Leaf intercellular spaces.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	10
1	INTRODUÇÃO GERAL	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	A seca e a produção agrícola	12
2.2	<i>Zea mays</i> L. (Poaceae).....	13
2.3	<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench. (Poaceae).....	14
2.4	Fisiologia das plantas sob déficit hídrico	15
2.5	Anatomia das plantas sob déficit hídrico	17
2.6	Tolerância das plantas sob déficit hídrico	18
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS	21
	REFERÊNCIAS	22
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	32
	ARTIGO 1 - LEAF INTERCELLULAR SPACES MODULATE THE GAS EXCHANGE OF <i>Sorghum bicolor</i> (L.) MOENCH. GROWN UNDER DIFFERENT WATER LEVELS	32
	ARTIGO 2 – A ÁREA FOLIAR E SUA INFLUÊNCIA NAS RESPOSTAS MORFOFISIOLÓGICAS EM PLANTAS DE <i>Zea mays</i> L. (POACEAE) EM CONDIÇÕES DE SECA	58
1	INTRODUÇÃO	60
2	MATERIAL E MÉTODOS	62
2.1	Material vegetal e projeto experimental	62
2.2	Análise do crescimento da planta e teor de água	62
2.3	Análise de trocas gasosas e conteúdo de clorofila	63
2.4	Eficiência no uso da água (WUE)	64
2.5	Análise anatômica	64
2.6	Análise estatística	65
3	RESULTADOS	66
4	DISCUSSÃO	75
5	CONCLUSÃO	81
	REFERÊNCIAS	82

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO GERAL

No cenário de mudanças climáticas as plantas estão sujeitas a fatores abióticos com mais frequência, principalmente pela redução dos níveis de água. O ambiente está cada vez mais seco e o estresse hídrico prejudica o crescimento, desenvolvimento e a qualidade das plantas, uma vez que a água é um dos principais recursos para a produtividade vegetal (ATZORI; MANCUSO; MASI, 2019; CHANDRA et al., 2021; NARAYAN et al., 2021). Além disso, a seca limita o transporte de nutrientes nas plantas pela redução da transpiração, o que causa alterações no metabolismo (ALBACETE; MARTÍNEZ-ANDÚJAR; PÉREZ-ALFOCEA, 2014; DA SILVA et al., 2011). Isso pode levar a diminuição da área foliar e da taxa fotossintética (YAN; ZHONG; SHANGGUAN, 2016). Este efeito intensifica-se em determinados pontos do ciclo fenológico (SOUZA et al., 2016). Portanto, para contornar essa situação de escassez de água buscam-se plantas que apresentam estratégias de tolerância à seca (MULLET, 2017).

Zea mays L., conhecida popularmente como milho, é uma espécie que necessita de grandes volumes de água para o seu desenvolvimento (GONG et al., 2015). A redução da disponibilidade hídrica é um fator estressante para esta planta (BEM-ARI et al., 2016; LOBELL et al., 2014). Apesar disso, o milho pode apresentar estratégias para evitar o estresse hídrico promovendo alterações na anatomia e na fisiologia das folhas. Por ser uma espécie sensível à seca o milho pode apresentar diferentes mecanismos morfofisiológicos interessantes (DÍAZ et al., 2018; MAGALHÃES et al., 2014). De fato, o milho quando submetido ao déficit hídrico possui alta plasticidade, por exemplo, aumento do comprimento radicular, do tamanho do córtex e da quantidade de aerênquima (ALI et al., 2016; BURTON et al., 2015; DÍAZ et al., 2018).

Sorghum bicolor (L.) Moench., conhecido popularmente como sorgo, é uma espécie tipicamente tolerante à seca (IMPA et al., 2019; WOLDESEMAYAT et al., 2017). Esta espécie é mais tolerante em comparação com outras plantas de metabolismo do tipo C₄ (LI et al., 2010). De forma semelhante ao milho, o sorgo, pode apresentar diversas respostas morfofisiológicas para tolerar as condições de seca. De fato, o sorgo possui alta plasticidade quando submetido ao estresse hídrico, por exemplo, redução do número de folhas e aumento da densidade estomática (IMPA et al., 2019; KAPLAN et al., 2019; MOROKE et al., 2011).

As modificações estruturais e fisiológicas das plantas de milho e de sorgo diante das condições de seca estão correlacionadas com o aumento da eficiência no uso da água. O aumento da eficiência no uso da água é considerado uma estratégia comum de espécies tolerantes à seca, pois evita a perda de água pela redução da transpiração. Sabe-se que as trocas gasosas estão diretamente relacionadas aos estômatos, o que influencia nesta eficiência (YOO et al., 2009). Dessa forma, os espaços intercelulares foliares podem atuar otimizando as trocas gasosas e diminuindo a perda de água durante a transpiração. Além disso, a área foliar também é importante para o controle da perda de água, uma vez que maior expansão foliar pode aumentar a densidade estomática ajustando as trocas gasosas. Estes ajustes podem auxiliar na captação de CO₂ e na taxa transpiratória ocasionando uma melhor eficiência no uso da água e no crescimento das plantas. Portanto, entender as características dos espaços intercelulares e da área foliar e suas relações na eficiência no uso da água e nas trocas gasosas é crucial para compreender os mecanismos que denotam tolerância e sobrevivência das plantas em ambientes secos.

Dessa forma, a hipótese deste trabalho é que as características anatômicas e fisiológicas foliares podem influenciar na tolerância à seca das plantas modulando respostas morfofisiológicas. Portanto, o objetivo geral do presente estudo foi avaliar o efeito do déficit hídrico na anatomia e nas trocas gasosas foliares relacionadas ao crescimento que atribuem características específicas de tolerância ao déficit hídrico em plantas de sorgo e milho.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A seca e a produção agrícola

As alterações climáticas estão causando modificações no volume hídrico e aumentando a ocorrência de estiagem (FIELD, 2014; STUART et al., 2011; SWEET et al., 2017). Isso possui relação direta com o aumento das atividades antrópicas causado pelo crescimento populacional e industrial (TESFAYE et al., 2018; YEPES; BUCKERIDGE, 2011). O evento de seca ocorre quando a condição atmosférica causa perda progressiva de água disponível no solo até o nível crítico para as plantas (YADAV et al., 2021; ZHOU et al., 2021), o que causa diversas alterações nas plantas devido ao estresse hídrico. De fato, o estresse hídrico é um dos resultados mais importantes das mudanças climáticas afetando negativamente o crescimento e o desenvolvimento das plantas (ASADI; ESHGHIZADEH, 2021; YADAV et al., 2021). Portanto, a redução da disponibilidade hídrica é uma grande ameaça para as espécies cultivadas. Isso afeta a produção agrícola e a segurança alimentar de milhões de pessoas, uma vez que a seca é um evento complexo devastando a colheita das plantas (HUSSAIN et al., 2018; KHOLOVÁ et al., 2010; MISHRA; SINGH, 2010).

O déficit hídrico vem afetando algumas regiões e países como o Irã (SHIRINBAYAN; KHOSRAVI; MALAKOUTI, 2019), nas altas planícies do Texas (ZHAO et al., 2018), África e Ásia (IMPA et al., 2019). Dessa forma, a redução hídrica está causando uma restrição severa na produção agrícola e tem impactos adversos na vida das pessoas (YADAV et al., 2021). O Brasil também sofre com o déficit hídrico, principalmente nas regiões do Nordeste e do Sudeste brasileiro (MARENGO et al., 2018; MARENGO et al., 2019). No Brasil o déficit hídrico é o fator chave de perdas significativas na agricultura (MARENGO et al., 2019; SANTOS et al., 2011). Portanto, é crucial o desenvolvimento de pesquisas para obter plantas com rendimentos mais eficientes e reduzir os impactos causados pela seca (SANTOS et al., 2011; YADAV et al., 2021).

De acordo com relatório da FAO (2018a) o estresse ambiental entre os anos 2005-2015 causou prejuízos na produção agrícola de 96 bilhões de dólares sendo que a escassez de água correspondeu a 29 bilhões, ou seja, aproximadamente 31% desse total. Essas perdas estão relacionadas com a redução da quantidade de plantio de espécies cultivadas (DUARTE et al., 2018). De fato, nos últimos 50 anos, 67% das perdas da colheita foram provocados pelo estresse hídrico (COMAS et al., 2013). Por causa disso, houve redução da produção interna bruta agrícola (PIB). Isso é corroborado por Kim et al. (2019). Ele observou que entre os anos

de 1983 - 2009 o déficit hídrico causou perdas de plantas cultivadas gerando um prejuízo correspondente a 166 bilhões de dólares reduzindo a produção interna bruta agrícola (PIB) em 0,8% com variações por país. Além disso, segundo a OMS (2020), a escassez de água afeta 40% da população mundial impactando, aproximadamente, 55 milhões de pessoas todos os anos e, portanto, até 2030 estas pessoas correm o risco de serem deslocadas de suas residências por causa da seca.

Portanto, tornam-se necessárias ações para minimizar os prejuízos causados pela seca no futuro. Ações como o racionamento de água, a redução do período de irrigação e a captação de água da chuva tornam-se importantes. Apesar disso, compreender as respostas de plantas a fatores abióticos, como a seca, e os mecanismos que denotam tolerância é uma das estratégias mais relevantes. Para isso, é necessário avaliar a anatomia e a fisiologia das plantas para compreender e preencher as lacunas sobre os mecanismos morfofisiológicos. De fato, a falta de dados e abordagens limitam ações mais efetivas (KREIBICH et al., 2019).

2.2 *Zea mays* L. (Poaceae)

Zea mays L., conhecida popularmente como milho pertencente à família Poaceae, é uma planta anual, variando de um a quatro metros de altura, apresentando o caule do tipo colmo e sistema radicular fasciculado. Além disso, possui o metabolismo do tipo C₄ e com comportamento isoídrico (SAGE et al., 1999; TARDIEU; SIMONNEAU, 1998). Este comportamento proporciona regulação nos movimentos estomáticos para reduzir a perda de água pela transpiração, por meio de ajustes na condutância estomática foliar prevenindo a embolia e atingindo uma alta eficiência no uso da água (ZHOU et al., 2021).

O milho é a terceira safra de grãos mais importantes do mundo vindo atrás do trigo e do arroz (CHIANGO et al., 2021; FAO, 2019) sendo que o Brasil é o 3º maior produtor mundial de milho, ficando atrás de EUA e China (FAO, 2014). Dessa forma, é uma das culturas mais amplamente cultivadas. A sua produção global anual chega a 1147 milhões de toneladas e fornece alimentos para muitas populações (SHAH; PRASAD; KUMAR, 2016; YAND; YAN, 2021) e é um recurso industrial importante (RIBAUT et al., 2009). Por causa disso, o consumo global de milho deverá aumentar nos próximos anos. Isso é corroborado pelo IGC (International Grains Council, 2019).

Apesar da produção da cultura do milho ser amplamente distribuída pelo mundo a escassez hídrica associada às mudanças climáticas está influenciando negativamente esta produção nos últimos anos. De fato, a seca é uma ameaça para a produção destas plantas

(BEM-ARI et al., 2016; LOBELL et al., 2014). O milho está entre as espécies cultivadas mais sensíveis às condições de seca, pois necessita de grandes volumes de água (GONG et al., 2015; XIN et al., 2018). Isso pode levar a reduções significativas na sua produtividade (BEM-ARI et al., 2016). Portanto, o milho possui grande importância econômica mundial e entender os mecanismos causados pelo estresse hídrico poderá auxiliar no aumento da produtividade da planta e na preservação da biodiversidade.

2.3 *Sorghum bicolor* (L.) Moench. (Poaceae)

O sorgo, *Sorghum bicolor* (L.) Moench., é uma espécie da família Poaceae e é um grão popular em todo o mundo, principalmente na África devido ao seu uso tradicional na alimentação (RASHWAN et al., 2021). De fato, a sua produção anual pode chegar a 63,9 milhões de toneladas de grãos (FAO, 2018b) e, inclusive, apresenta uma área de cultivo de 5,8 milhões de hectares (FAO, 2017). O sorgo apresenta o sistema radicular fasciculado extenso que pode atingir de 1 a 3 metros de profundidade. O caule é do tipo colmo e o seu fruto é uma cariopse ou grão seco (BORÉM; PIMENTEL; PARRELLA, 2014; HILSON, 1916; HOUSE, 1985). Acredita-se que as plantas de sorgo tenham sido domesticadas na Índia por volta de 3700-2900 a.C (BARRON et al., 2020), mas é nativa dos países africanos (DEVNARAIN et al., 2019).

O sorgo possui grande importância econômica (JENKINS et al., 2020). Isso está relacionado com a alta produtividade de sequeiro e é uma das principais culturas de cereais cultivadas globalmente (BARRON et al., 2020; FULLER; STEVENS, 2018). Além disso, destaca-se na alimentação básica de muitos países (IMPA et al., 2019; TARI et al., 2013). Devido ao cultivo global as plantas de sorgo demonstram-se uma ampla adaptação às mudanças climáticas. Isso proporciona ao sorgo crescer em regiões com baixa disponibilidade de água. Portanto, nota-se que o plantio desta cultura pode ser uma solução sustentável para os agricultores no combate às mudanças climáticas (BALAKRISHNA et al., 2019).

Neste contexto, o sorgo é a principal cultura cultivada em condições de seca (HADEBE; MABHAUDHI; MODI, 2020) e é considerado tolerante ao déficit hídrico (IMPA et al., 2019). Por essa razão, o sorgo é amplamente utilizado nos estudos como modelo ideal para avaliar as modificações das plantas nos ambientes secos (GUHA et al., 2018; YANG et al., 2020). Apesar da tolerância à seca o sorgo pode apresentar modificações que afeta sua produtividade. De fato, o déficit hídrico reduziu a produção de sorgo em 36 e 55%, nos estágios vegetativo e reprodutivo, respectivamente (ASSEFA; STAGGENBORG; PRASAD,

2010). No entanto, estas modificações podem ser mecanismos para melhorar o desempenho das plantas em condições de seca. Asadi e Eshgizadeh (2021) observaram que a escassez de água diminuiu o peso seco das plantas de sorgo, mas aumentou a sua tolerância. Portanto, estudar os mecanismos que regem a tolerância à seca pelas plantas de sorgo pode auxiliar em programas de melhoramento genético e no entendimento das principais estratégias destas plantas que denotam tolerância em ambientes secos.

2.4 Fisiologia das plantas sob déficit hídrico

A água é um recurso extremamente fundamental para o crescimento e desenvolvimento das plantas e a sua disponibilidade depende da variabilidade climática (DEVNARAIN et al., 2019). A água é um fator chave para a distribuição da vegetação nos ecossistemas (ZHOU et al., 2021). Com as mudanças climáticas espera-se que os eventos de seca se intensifiquem nos próximos anos e as plantas estarão sujeitas ao estresse abiótico com mais frequência gerando um grande desafio para a segurança alimentar global (BERTOLINO; CAINE; GRAY, 2019; GAO et al., 2019; KISSOUDIS et al., 2014). Isso corrobora alguns modelos climáticos que indicam a diminuição das chuvas e o aumento das secas devido ao aquecimento global (FIELD, 2014; STUART et al., 2011; SWEET et al., 2017). Neste contexto, a redução da disponibilidade hídrica ocasiona perdas e limitações significativas nas plantas, pois causa modificações morfofisiológicas afetando a sua produtividade (ABDALLAH et al., 2018; KIM et al., 2019; MARENCO et al., 2018; SHIRINBAYAN; KHOSRAVI; MALAKOUTI, 2019).

A seca (ou déficit hídrico) é caracterizada quando a quantidade de água perdida pelo vegetal é maior do que a sua absorção e seus efeitos dependem da intensidade e do período de exposição das plantas (COSTA; PINHO; PARRY, 2008) e dependendo da intensidade e da duração do período de seca pode ser classificada em quatro categorias: fraca, moderada, severa e extrema (DUARTE et al., 2018). Por essa razão, o déficit hídrico torna a relação planta-água menos estável prejudicando o crescimento, o desenvolvimento (PAREEK; SOPORY; BOHNERT, 2010) e a produtividade das plantas (XIN et al., 2018) e, inclusive, afeta 60% da área terrestre global (RABARA et al., 2015). Dessa forma, muitos estudos buscam entender o comportamento das plantas nesses ambientes. Isso é corroborado por Nendel et al. (2014) e Zong e Shangguan (2014). Segundo Jenkins et al. (2020) e estes estudos são necessários para melhorar a gestão do uso da água e garantir o sucesso da agricultura.

O estresse hídrico causa uma série de modificações nas plantas. As plantas apresentam alterações nas características morfológicas e fisiológicas que advêm da aclimação sob condições de seca. Essas alterações ocorrem, principalmente, nas raízes e nas folhas (POTTERS et al., 2007; SHAO et al., 2008). O déficit hídrico pode reduzir severamente o crescimento das plantas. Isso tem relação com a diminuição da divisão celular e o turgor, uma vez que o estresse hídrico dificulta a divisão e a extensão celular (GAO et al., 2008; NAYARAN et al., 2021). Além disso, a redução do crescimento das plantas em condições de seca pode estar relacionada com a diminuição da área foliar e conteúdo de clorofila, restrição da transpiração, fechamento estomático, menor acúmulo de carboidratos, caules mais curtos e grossos, folhas eretas, sistema radicular profundo e com poucas ramificações, aceleração da senescência e abscisão das folhas, redução dos espaços intercelulares e do tamanho das células do mesofilo (AMOUZOU et al., 2019; HE et al., 2017; RAMAMOORTHY et al., 2017; TORRE et al., 2021; WHITE et al., 2015; YADAV et al., 2021; YAN; ZHONG; SHANGGUAN, 2016; ZHAO et al., 2018; ZHAN; SCHNEIDER; LYNCH, 2015).

Outro aspecto interessante é que a escassez de água resultou em reduções da concentração de carbono intercelular, da taxa fotossintética, da taxa transpiratória e da condutância estomática podendo estar relacionada com as limitações na difusão dos gases através dos estômatos (ABDALLAH et al., 2018; CHATURVEDI et al., 2021; FLEXAS et al., 2007; SOUZA et al., 2013; TORRE et al., 2021). Sendo que os efeitos mais importantes causados pela escassez hídrica são: redução da taxa fotossintética, da condutância estomática e da senescência foliar (FAROOQ et al., 2009). Isso tem relação com o fechamento precoce dos estômatos e da resistência para a difusão dos gases (BOYLE; MCAINSH; DODD, 2016) ou pelo comprometimento metabólico provocado pelo estresse hídrico, uma vez que o transporte de nutrientes também é limitado pelo declínio na transpiração (ALBACETE; MARTÍNEZ-ANDÚJAR; PÉREZ-ALFOCEA, 2014; DA SILVA et al., 2011). Além disso, a formação das espécies reativas de oxigênio (EROs) nos tecidos é uma das primeiras respostas das plantas expostas ao estresse hídrico e a produção destes pode causar efeitos prejudiciais devido ao estresse oxidativo (ABBAS et al., 2019; ASADI; ESHGHIZADEH, 2021; RAHEEM et al., 2018; YOU; CHAN, 2015).

Os efeitos do déficit hídrico dependem da intensidade e da duração e, inclusive, da espécie vegetal. Isso proporciona várias respostas devido ao contraste de tolerância ou sensibilidade das plantas em condições de seca. De fato, verificar a tolerância das espécies ao estresse hídrico é essencial (FAGHANI et al., 2015). Além disso, vários parâmetros fisiológicos têm sido usados como indicadores quantitativos para avaliar o estresse hídrico como o conteúdo

relativo de água, a taxa de abertura estomática e a eficiência no uso da água. Segundo Meenam et al. (2020) estes parâmetros fisiológicos mudam rapidamente em plantas sensíveis, mas menos nas plantas tolerantes. Dentre os índices citados a eficiência no uso da água destaca-se em estudos de seca, pois aparece em publicações mais clássicas para avaliar os efeitos das variações ambientais (ZELITCH; WAGGONER, 1962). Este pode ser calculado pela razão entre a assimilação de CO₂ e a perda de água pelas plantas por transpiração ou pela relação da massa seca ganha em função da massa/volume de água perdida pela planta (KRAMER; BOYER, 1995). Dessa forma, o índice depende da transpiração e da fotossíntese que estão diretamente relacionadas com os espaços intercelulares e com a área foliar. Portanto, quantificar as variáveis fisiológicas em estudos envolvendo as relações hídricas no sistema solo-planta-atmosfera é necessário, pois auxilia na compreensão das estratégias de aclimação das espécies vegetais e propor um planejamento e um manejo mais adequado.

2.5 Anatomia das plantas sob déficit hídrico

O déficit hídrico promove alterações anatômicas nas plantas. As modificações anatômicas desempenham um papel importante, uma vez que auxilia e determina o crescimento e a aptidão das plantas (TORRE et al., 2021) e estas surgem como mecanismos para resistir, evitar ou tolerar as limitações de água prolongadas (CHALLABATHULA; ZHANG; BARTELS, 2018). Dessa forma, as plantas em condições de déficit hídrico podem apresentar aumento na espessura da exoderme, maior número de elementos do metaxilema, menor diâmetro dos elementos de vaso, alterações nos pigmentos, aumento na densidade e no índice estomático, menor distância entre os feixes vasculares, aumento na proporção de aerênquima no córtex e mudanças estruturais na endoderme (BHUSAL; HAN; YOON, 2019; GUHA et al., 2018; LAVINSKY et al., 2015; MAGALHAES; SOUZA; ALBUQUERQUE, 2012; SOUZA et al., 2016; TORRE et al., 2021). Além disso, a grande parte das mudanças anatômicas causadas pela escassez de água está relacionada ao sistema vascular devido ao transporte de água. De fato, o estresse hídrico pode reduzir a quantidade dos tecidos condutores (FANG; XIONG, 2015; GUHA et al., 2018) evitando a embolia e garantindo a manutenção do transporte de água (CHOA et al., 2016). Assim, os espaços intercelulares e as alterações na área foliar podem estar associados ao sistema vascular da planta. Essas modificações podem influenciar no tamanho, no número e na distribuição dos vasos do xilema e do floema.

Outra alteração importante das plantas em condições de seca é o aumento dos espaços intercelulares. O estresse hídrico pode induzir a formação de espaços intercelulares auxiliando na difusão dos gases (NI et al., 2014; SOUZA et al., 2016). De fato, a formação dos espaços intercelulares está diretamente relacionada às condições impostas pelo ambiente (EVANS, 2004; GONÇALVES; LYNCH, 2014; NI et al., 2014; YAMAUCHI et al., 2013). Além disso, pode ocorrer o aumento no tamanho e na densidade das células (BOSABALIDIS; KOFIDIS, 2002; CHARTZOULAKIS et al., 2002) ou redução destas (TORRE et al., 2021), folhas mais espessas e menores, aumento na quantidade de tricomas na epiderme foliar, estômatos menores, aumento da espessura da cutícula na epiderme (FANG; XIONG, 2015) e diminuição da área foliar. A redução da área foliar está relacionada com as reduções na espessura do parênquima clorofiliano e das células epidérmicas (LOBATO et al., 2020; TORRE et al., 2021).

Estas modificações podem estar relacionadas com a melhor eficiência no uso da água pelas plantas. Espécies de plantas submetidas ao estresse hídrico aumentam a densidade estomática permitindo maior eficiência no uso da água (MELO et al., 2007). Isso tem relação com uma melhor assimilação de carbono pela fotossíntese e pela diminuição na perda de água por transpiração (MELO et al., 2007; VILLAR-SALVADOR et al., 2004; THOMAS, 2009). Além disso, a formação de espaços intercelulares pode melhorar o crescimento da planta e reduzir os recursos metabólicos (CHIMUNGU et al., 2015). Portanto, nota-se que os espaços intercelulares constituem uma importante característica diante da seca e podem influenciar na transpiração reduzindo a perda de água e, inclusive, podem atuar direta ou indiretamente na expansão foliar.

2.6 Tolerância das plantas sob déficit hídrico

Espécies tolerantes e sensíveis à seca, como o sorgo e o milho, respectivamente, possuem várias modificações morfofisiológicas. Isso tem relação com as respostas celulares diante da seca e a capacidade de adaptação e sobrevivência depende destes sinais (BENGOUGH et al., 2006). A resposta mais comum de tolerância das plantas à seca envolve a diminuição da perda de água. Dessa forma, apresentam-se modificações na anatomia foliar que incluem alta densidade estomática e redução na abertura dos estômatos conservando a água na folha pela otimização da transpiração (MAHAJAN; TUTEJA, 2005; MOROKE et al., 2011; SOFO et al., 2008). Além disso, a limitação hídrica causa o estresse osmótico na célula vegetal (ABDALLAH et al., 2018). Para minimizar o estresse osmótico ocorre o aumento da

retenção de água (CHARTZOULAKIS; PATAKAS; BOSABALIDIS, 1999; RIBAUT et al., 2009). De fato, as características ligadas com a regulação osmótica e a retenção de água nas plantas são atributos essenciais para a sobrevivência das espécies tolerantes à seca, constituindo um dos mecanismos fisiológicos mais eficazes para a manutenção da turgescência celular (MARIJUAN; BOSCH, 2013; POORTER; MARKESTEIJN, 2008).

Outras alterações importantes nas plantas para tolerância em condições de seca envolvem a rápida senescência dos órgãos vegetativos diminuindo o custo metabólico e, portanto, possuem maior capacidade de acumulação de biomassa (CHATURVEDI et al., 2021; IMPA et al., 2019). A grande parte dessa biomassa é acumulada nas raízes o que aumenta a profundidade do sistema radicular elevando a probabilidade de obtenção de água (JOHNSON et al., 2016; SOUZA et al., 2016). Além disso, as plantas tolerantes apresentam mudanças nos vasos foliares, resistência à desidratação das células e maior deposição de ceras foliares (MAGALHÃES; DURÃES; PAIVA, 1995). Este último desempenha um papel importante na tolerância à seca, uma vez que evita a perda de água por transpiração não estomática preservando o conteúdo de água nas folhas (SANJARI et al., 2021).

O papel de tolerância à seca nas plantas também incluem regulação do movimento estomático e da condutância estomática das folhas (ZHOU et al., 2021), da eficiência no uso de proteínas, do sistema enzimático e da regulação do sistema fotossintético (ABDALLAH et al., 2018; CRUZ DE CARVALHO, 2008; XIN et al., 2018). Isso está relacionado com a osmorregulação por solutos compatíveis, como a prolina. Estes protegem as enzimas e estruturas de membrana reduzindo os radicais livres e mantendo o teor de água nas plantas (ASADI; ESHGHIZADEH, 2021). Além disso, as aquaporinas também desempenham uma importante função na tolerância à seca, uma vez que mantêm o equilíbrio de água nas plantas e o balanço hídrico celular (SHIVARAJ et al., 2021).

Portanto, o déficit hídrico é limitante ao crescimento, desenvolvimento e sobrevivência das plantas. Dessa forma, as plantas evoluíram mecanismos eficientes para resistir sob tais condições, como ajustes na anatomia foliar e no controle das trocas gasosas. Isso permite a manutenção da biomassa das plantas refletindo no seu rendimento ou estabilidade da produção vegetal (COOPER et al., 2014; LAVINSKY et al., 2015). Apesar disso, estes ajustes são limitados pelos estômatos, uma vez que a captação de CO₂ e a perda de água ocorrem por eles refletindo na eficiência no uso da água (ZELITCH; WAGGONER, 1962) e uma vez que a transpiração depende da superfície interna do mesófilo, os estudos dos espaços intercelulares e a relação com a expansão foliar tornam-se extremamente importantes. Neste contexto, espécies contrastantes à seca como o milho e o sorgo empregados como

modelos em estudos de déficit hídrico podem oferecer respostas interessantes para entender as diferentes respostas das espécies em condições de estresse hídrico e permitir compreender a relação da seca com as trocas gasosas e com a anatomia foliar. De fato, a busca por espécies tolerantes à seca é considerada um objetivo essencial (ZHAO et al., 2018).

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Longos períodos de déficit hídrico são causados por alterações climáticas e aquecimento global. Esses eventos abióticos podem resultar em mudanças estruturais nas plantas e assim afetar a produtividade de espécies agrícolas.

Apesar disso, espécies de plantas que possuem tolerância à seca podem ser uma alternativa para a adaptação nos ambientes propícios a tais condições. Assim, pretende-se buscar com o estudo entender as características anatômicas que regem a tolerância à seca nas plantas e agregar a literatura. Além disso, os resultados obtidos com o trabalho auxiliarão os programas de melhoramento genético, na produção agrícola e na preservação da biodiversidade bem como ajudarão a compreender como as plantas tolerantes ajustam a sua eficiência no uso da água em condições de seca.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, S. M. *et al.* Exogenous application of salicylic acid at different plant growth stages improves physiological processes in marigold (*Tagetes erecta* L.). **Pakistan Journal of Agricultural Sciences**, Pakistan, v. 56, n. 3, 2019.
- ABDALLAH, M. B. *et al.* Unraveling physiological, biochemical and molecular mechanisms involved in olive (*Olea europaea* L. cv. *Chétoui*) tolerance to drought and salt stresses. **Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 220, p. 83-95, 2018.
- ALBACETE, A. A.; MARTÍNEZ-ANDÚJAR, C; PÉREZ-ALFOCEA, F. Hormonal and metabolic regulation of source–sink relations under salinity and drought: from plant survival to crop yield stability. **Biotechnology Advances**, New York, v. 32, n. 1, p. 12-30, 2014.
- ALI, Q. *et al.* Screening for drought tolerance: comparison of maize hybrids under water deficit condition. **Advancements in Life Sciences**, Lahore Pakistan, v. 3, n. 2, p. 51-58, 2016.
- AMOUZOU, K. A. *et al.* Climate change impact on water-and nitrogen-use efficiencies and yields of maize and sorghum in the northern Benin dry savanna, West Africa. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 235, p. 104-117, 2019.
- ASADI, M.; ESHGHIZADEH, H. R. Response of sorghum genotypes to water deficit stress under different CO₂ and nitrogen levels. **Plant Physiology and Biochemistry**, France, v. 158, p. 255-264, 2021.
- ASSEFA, Y.; STAGGENBORG, S. A.; PRASAD, V. P. V. Grain sorghum water requirement and responses to drought stress: A review. **Crop Management**, United States, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2010.
- ATZORI, G.; MANCUSO, S.; MASI, E. Seawater potential use in soilless culture: A review. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 249, p. 199-207, 2019.
- BALAKRISHNA, D. *et al.* Tissue Culture and Genetic Transformation in *Sorghum bicolor*. **Breeding Sorghum for diverse end uses**, Woodhead Publishing, p. 115-130, 2019.
- BARRON, A. *et al.* Snapshots in time: MicroCT scanning of pottery sherds determines early domestication of sorghum (*Sorghum bicolor*) in East Africa. **Journal of Archaeological Science**, United Kingdom, v. 123, p. 105259, 2020.
- BEN-ARI, T. *et al.* Identifying indicators for extreme wheat and maize yield losses. **Agricultural and Forest Meteorology**, Amsterdam, v. 220, p. 130-140, 2016.
- BENGOUGH, A. G. *et al.* Root responses to soil physical conditions; growth dynamics from field to cell. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 2, p. 437-447, 2006.
- BERTOLINO, L. T.; CAINE, R. S.; GRAY, J. E. Impact of stomatal density and morphology on water-use efficiency in a changing world. **Frontiers in plant science**, Switzerland, v. 10, p. 225, 2019.

- BHUSAL, N.; HAN, S. G.; YOON, T. M. Impact of drought stress on photosynthetic response, leaf water potential, and stem sap flow in two cultivars of bi-leader apple trees (*Malus × domestica* Borkh.). **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 246, p. 535-543, 2019.
- BORÉM, A.; PIMENTEL, L.; PARRELLA, R. **Sorgo do plantio à colheita**. UFV: Viçosa, p. 275, 2014.
- BOSABALIDIS, A. M.; KOFIDIS, G. Comparative effects of drought stress on leaf anatomy of two olive cultivars. **Plant Science**, Shannon, v. 163, n. 2, p. 375-379, 2002.
- BOYLE, R. K.; MCAINSH, M.; DODD, I. C. Stomatal closure of *Pelargonium x hortorum* in response to soil water deficit is associated with decreased leaf water potential only under rapid soil drying. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 156, n. 1, p. 84-96, 2016.
- BURTON, A. L. *et al.* QTL mapping and phenotypic variation of root anatomical traits in maize (*Zea mays* L.). **Theoretical and applied genetics**, Switzerland, v. 128, n. 1, p. 93-106, 2015.
- CAI, F. *et al.* Maize (*Zea mays* L.) physiological responses to drought and rewatering, and the associations with water stress degree. **Agricultural Water Management**, Netherlands, v. 241, p. 106379, 2020.
- CHANDRA, P. *et al.* Strategies to mitigate the adverse effect of drought stress on crop plants- influences of soil bacteria: A review. **Pedosphere**, China, v. 31, n. 3, p. 496-509, 2021.
- CHALLABATHULA, D.; ZHANG, Q.; BARTELS, D. Protection of photosynthesis in desiccation-tolerant resurrection plants. **Journal of plant physiology**, Minneápolis, v. 227, p. 84-92, 2018.
- CHATURVEDI, R. K. *et al.* Functional traits indicate a continuum of tree drought strategies across a soil water availability gradient in a tropical dry forest. **Forest Ecology and Management**, Netherlands, v. 482, p. 118740, 2021.
- CHARTZOULAKIS, K. *et al.* Water stress affects leaf anatomy, gas exchange, water relations and growth of two avocado cultivars. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 95, p. 39-50, 2002.
- CHARTZOULAKIS, K.; PATAKAS, A.; BOSABALIDIS, A. M. Changes in water relations, photosynthesis and leaf anatomy induced by intermittent drought in two olive cultivars. **Environmental and experimental botany**, England, v. 42, n. 2, p. 113-120, 1999.
- CHIANGO, H. *et al.* Assessing drought tolerance of traditional maize genotypes of Mozambique using chlorophyll fluorescence parameters. **South African Journal of Botany**, South Africa, v. 138, p. 311-317, 2021.
- CHIMUNGU, J. G. *et al.* Utility of root cortical aerenchyma under water limited conditions in tropical maize (*Zea mays* L.). **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 171, p. 86-98, 2015.
- CHOA, B. *et al.* Noninvasive measurement of vulnerability to drought-induced embolism by X-ray microtomography. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 170, p. 273-282, 2016.

- COMAS, L. *et al.* Root traits contributing to plant productivity under drought. **Frontiers in plant science**, Switzerland, v. 4, p. 442, 2013.
- COOPER, M. *et al.* Breeding drought-tolerant maize hybrids for the US corn-belt: discovery to product. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 65, n. 21, p. 6191-6204, 2014.
- COSTA, J. R.; PINHO, J. L. N; PARRY, M. M. Produção de matéria seca de cultivares de milho sob diferentes níveis de estresse hídrico. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande – PB, v. 12, n. 5, p. 443-451, 2008.
- CRUZ DE CARVALHO, M. H. Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling. **Plant signaling & behavior**, England, v. 3, n. 3, p. 156-165, 2008.
- DA SILVA, E. C. *et al.* Drought stress and plant nutrition. **Plant stress**, Lemesos, v. 5, n. 1, p. 32-41, 2011.
- DEVNARAIN, N. *et al.* Transcriptomic analysis of a *Sorghum bicolor* landrace identifies a role for beta-alanine betaine biosynthesis in drought tolerance. **South African Journal of Botany**, South Africa, v. 127, p. 244-255, 2019.
- DÍAZ, A. S. *et al.* Aerenchyma development in different root zones of maize genotypes under water limitation and different phosphorus nutrition. **Biologia plantarum**, Praga, v. 62, n. 3, p. 561-568, 2018.
- DUARTE, J. G. P. *et al.* Droughts and Impacts on Agriculture in the Municipality of Campina Grande-PB. **Revista Brasileira de Meteorologia**, São José dos Campos – SP, v. 33, n. 2, p. 289-297, 2018.
- EVANS, D. E. Aerenchyma formation. **New phytologist**, Reino Unido, v. 161, n. 1, p. 35-49, 2004.
- FAGHANI, E. *et al.* Comparative physiology and proteomic analysis of two wheat genotypes contrasting in drought tolerance. **Journal of proteomics**, Amsterdam, v. 114, p. 1-15, 2015.
- FANG, Y.; XIONG, L. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 72, p. 673-689, 2015.
- FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, Maize, rice and wheat: area harvested, production quantity, yield, **Statistics Division**, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>. Publicado em 2014.
- FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, online database, **Statistics Division**, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Publicado em 2017.
- FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, Disasters causing billions in agricultural losses, with drought leading the way, **Statistics Division**, <http://www.fao.org/news/story/en/item/1106977/icode/>. Publicado em 2018a.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, online database, **Statistics Division**, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Publicado em 2018b.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, **Statistics Division**, <http://www.fao.org/faostat/en/#data>. Publicado em 2019.

FAROOQ, M. *et al.* Plant drought stress: effects, mechanisms and management. **Sustainable agriculture**, Netherlands, p. 153-188, 2009.

FIELD, C. B. **Climate change 2014–Impacts, adaptation and vulnerability: Regional aspects**. Cambridge: University Press, 2014.

FLEXAS, J. *et al.* Rapid variations of mesophyll conductance in response to changes in CO₂ concentration around leaves. **Plant, Cell & Environment**, Escócia v. 30, n. 10, p. 1284-1298, 2007.

FULLER, D. Q.; STEVENS, C. J. Sorghum domestication and diversification: a current archaeobotanical perspective. **Plants and people in the African past**, África, p. 427-452, 2018.

GAO, Q. *et al.* Expansins and coleoptile elongation in wheat. **Protoplasma**, Áustria, v. 233, n. 1-2, p. 73, 2008.

GAO, C. *et al.* Water requirement of summer maize at different growth stages and the spatiotemporal characteristics of agricultural drought in the Huaihe River Basin, China. **Theoretical and Applied Climatology**, Switzerland, v. 136, n. 3, p. 1289-1302, 2019.

GONÇALVES, S. L.; LYNCH, J. P. Raízes de plantas anuais: tolerância a estresses ambientais, eficiência na absorção de nutrientes e métodos para seleção de genótipos. **Embrapa Soja-Documentos (INFOTECA-E)**, Londrina: Embrapa Soja, 67 p., 2014.

GONG, F. *et al.* Making better maize plants for sustainable grain production in a changing climate. **Frontiers in Plant Science**, Austrália, v. 6, p. 835, 2015.

GUHA, A. *et al.* Hydraulic anatomy affects genotypic variation in plant water use and shows differential organ specific plasticity to drought in *Sorghum bicolor*. **Environmental and Experimental Botany**, England, v. 156, p. 25-37, 2018.

HADEBE, S. T.; MABHAUDHI, T.; MODI, A. T. Water productivity of selected sorghum genotypes under rainfed conditions. **International Journal of Plant Production**, Switzerland, p. 1-14, 2020.

HE, J. *et al.* Conserved water use improves the yield performance of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) under drought. **Agricultural Water Management**, New York, v. 179, p. 236-245, 2017.

HILSON, G. R. On the inheritance of certain stem characters in sorghum. **Indian Journal of Agricultural Research**, India, v. 11, p. 150-155, 1916.

HOUSE, L. R. **A Guide to Sorghum Breeding Second Edition**. p. 1-220, 1985.

HUSSAIN, M. *et al.* Drought stress in sunflower: Physiological effects and its management through breeding and agronomic alternatives. **Agricultural water management**, Netherlands, v. 201, p. 152-166, 2018.

IGC. INTERNATIONAL GRAINS COUNCIL, Five-year global supply and demand projections, <https://www.igc.int/en/markets/5yeardownload.aspx?mode=download>, p. 1-32. Publicado em 2019.

IMPA, S. M. *et al.* Water deficit and heat stress induced alterations in grain physico-chemical characteristics and micronutrient composition in field grown grain sorghum. **Journal of Cereal Science**, London, v. 86, p. 124-131, 2019.

JENKINS, E. L. *et al.* Assessing past water availability using phytoliths from the C₄ plant *Sorghum bicolor*: An experimental approach. **Journal of Archaeological Science: Reports**, United Kingdom, v. 33, p. 102460, 2020.

JOHNSON, D. M. *et al.* A test of the hydraulic vulnerability segmentation hypothesis in angiosperm and conifer tree species. **Tree physiology**, United Kingdom, v. 36, n. 8, p. 983-993, 2016.

KAPLAN, M. *et al.* Water deficit and nitrogen affects yield and feed value of sorghum sudangrass silage. **Agricultural Water Management**, New York, v. 218, p. 30-36, 2019.

KHOLOVÁ, J. *et al.* Constitutive water-conserving mechanisms are correlated with the terminal drought tolerance of pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.]. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 61, n. 2, p. 369-377, 2010.

KIM, W. *et al.* Global patterns of crop production losses associated with droughts from 1983 to 2009. **Journal of Applied Meteorology and Climatology**, Washington, 2019.

KISSOUDIS, C. *et al.* Enhancing crop resilience to combined abiotic and biotic stress through the dissection of physiological and molecular crosstalk. **Frontiers in Plant Science**, Switzerland, v. 5, p. 207, 2014.0

KRAMER, P. J.; BOYER, J. S. **Water relations of plants and soils**. Academic press (San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo e Toronto), 1995.

KREIBICH, H. *et al.* How to improve attribution of changes in drought and flood impacts. **Hydrological Sciences Journal**, England, v. 64, n. 1, p. 1-18, 2019.

LAVINSKY, A. O. *et al.* Partitioning between primary and secondary metabolism of carbon allocated to roots in four maize genotypes under water deficit and its effects on productivity. **The Crop Journal**, China, v. 3, n. 5, p. 379-386, 2015.

LI, R. *et al.* Genetic diversity in Chinese sorghum landraces revealed by chloroplast simple sequence repeats. **Genetic resources and crop evolution**, Switzerland, v. 57, n. 1, p. 1-15, 2010.

- LOBATO, S. M. *et al.* Root-differential modulation enhances nutritional status and leaf anatomy in pigeonpea plants under water deficit. **Flora**, Germany, v. 262, p. 151519, 2020.
- LOBELL, D. B. *et al.* Greater sensitivity to drought accompanies maize yield increase in the US Midwest. **Science**, United Kingdom, v. 344, n. 6183, p. 516-519, 2014.
- MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M.; PAIVA, E. **Fisiologia da planta de milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 27 p. 1995.
- MAGALHAES, P. C.; SOUZA, T. C.; ALBUQUERQUE, P. E. P. Efeitos do estresse hídrico na produção de grãos e na fisiologia da planta de milho. **Embrapa Milho e Sorgo-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 37 p, 2012.
- MAGALHAES, P. C. *et al.* Caracterização do sistema radicular e dos componentes da produtividade em quatro genótipos de milho cultivados sob déficit hídrico. **Embrapa Milho e Sorgo-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 25 p, 2014.
- MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: an overview. **Archives of biochemistry and biophysics**, Netherlands, v. 444, n. 2, p. 139-158, 2005.
- MARIJUAN, M. P.; BOSCH, S. M. Ecophysiology of invasive plants: osmotic adjustment and antioxidants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 18, p. 660-666, 2013.
- MARENGO, J. A. *et al.* Climatic characteristics of the 2010-2016 drought in the semiarid Northeast Brazil region. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 90, n. 2, p. 1973-1985, 2018.
- MARENGO, J. A. *et al.* Increase Risk of Drought in the Semiarid Lands of Northeast Brazil Due to Regional Warming above 4 C. In: **Climate Change Risks in Brazil**, Switzerland, p. 181-200, 2019.
- MEETAM, M. *et al.* Assessment of physiological parameters to determine drought tolerance of plants for extensive green roof architecture in tropical areas. **Urban Forestry & Urban Greening**, Germany, v. 56, p. 126874, 2020.
- MELO, H. D. *et al.* Alterações anatômicas e fisiológicas em *Setaria anceps* Stapf ex Massey e *Paspalum paniculatum* L. sob condições de déficit hídrico. **Hoehnea**, Brazil, v. 34, n. 2, p. 145-153, 2007.
- MISHRA, A. K.; SINGH, V. P. A review of drought concepts. **Journal of hydrology**, Amsterdam, v. 391, n. 1-2, p. 202-216, 2010.
- MOROKE, T. S. *et al.* Water use efficiency of dryland cowpea, sorghum and sunflower under reduced tillage. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v. 112, n. 1, p. 76-84, 2011.
- MULLET, J. E. High-biomass C₄ grasses-Filling the yield gap. **Plant science**, Clare, v. 261, p. 10-17, 2017.

- NARAYAN, J. A. *et al.* Overexpression of expansin EaEXPA1, a cell wall loosening protein enhances drought tolerance in sugarcane. **Industrial Crops and Products**, London, v. 159, p. 113035, 2021.
- NENDEL, C. *et al.* Testing farm management options as climate change adaptation strategies using the MONICA model. **European Journal of Agronomy**, France, v. 52, p. 47-56, 2014.
- NI, X. L. *et al.* Programmed cell death during aerenchyma formation in *Typha angustifolia* leaves. **Aquatic Botany**, Amsterdam, v. 113, p. 8-18, 2014.
- OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, Drought. https://www.who.int/health-topics/drought#tab=tab_1. Acesso em 16-02-2021. Publicado em 2020.
- PAREEK, A.; SOPORY, S. K.; BOHNERT, H. J. **Abiotic stress adaptation in plants**. Dordrecht, Switzerland: springer, 2010.
- POTTERS, G. *et al.* Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? **Trends in plant science**, Oxford, v. 12, n. 3, p. 98-105, 2007.
- POORTER, L.; MARKESTEIJN, L. Seedling traits determine drought tolerance of tropical tree species. **Biotropica**, United States, v. 40, n. 3, p. 321-331, 2008.
- RABARA, R. C. *et al.* Tobacco drought stress responses reveal new targets for Solanaceae crop improvement. **BMC genomics**, London, v. 16, n. 1, p. 484, 2015.
- RAHEEM, A. *et al.* Auxin production by rhizobacteria was associated with improved yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) under drought stress. **Archives of Agronomy and Soil Science**, United Kingdom, v. 64, n. 4, p. 574-587, 2018.
- RAMAMOORTHY, P. *et al.* Root traits confer grain yield advantages under terminal drought in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Field crops research**, Amsterdam, v. 201, p. 146-161, 2017.
- RASHWAN, A. K. *et al.* Potential processing technologies for developing sorghum-based food products: An update and comprehensive review. **Trends in Food Science & Technology**, United Kingdom, v. 110, p. 168-182, 2021.
- RIBAUT, J. M. *et al.* Drought tolerance in maize. **Handbook of maize: its biology**. Springer, New York, NY, p. 311-344, 2009.
- SAGE, R. F. *et al.* The biogeography of C₄ photosynthesis: patterns and controlling factors. **C4 plant biology**, Canadá, v. 10, p. 313-376, 1999.
- SANJARI, S. *et al.* Molecular, chemical, and physiological analyses of sorghum leaf wax under post-flowering drought stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, France, v. 159, p. 383-391, 2021.
- SANTOS, R. S. D. *et al.* Avaliação da relação seca/produtividade agrícola em cenário de mudanças climáticas. **Revista Brasileira de Meteorologia**, São José dos Campos – SP, v. 26, n. 2, p. 313-321, 2011.

SHAH, T. R.; PRASAD, K.; KUMAR, P. Maize-A potential source of human nutrition and health: A review. **Cogent Food & Agriculture**, Londres, v. 2, n. 1, p. 1166995, 2016.

SHAO, H. B. *et al.* Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. **Comptes rendus biologiques**, France, v. 331, n. 3, p. 215-225, 2008.

SHIRINBAYAN, S.; KHOSRAVI, H.; MALAKOUTI, M. J. Alleviation of drought stress in maize (*Zea mays*) by inoculation with Azotobacter strains isolated from semi-arid regions. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 133, p. 138-145, 2019.

SHIVARAJ, S. M. *et al.* Dynamic role of aquaporin transport system under drought stress in plants. **Environmental and Experimental Botany**, England, p. 104367, 2021.

SOFO, A. *et al.* The olive tree: a paradigm for drought tolerance in Mediterranean climates. **Hydrology and Earth System Sciences Discussions**, Germany, v. 12, n. 1, p. 293-301, 2008.

SOUZA, T. C. *et al.* Morphophysiology, morphoanatomy, and grain yield under field conditions for two maize hybrids with contrasting response to drought stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, Kraków, v. 35, n. 11, p. 3201-3211, 2013.

SOUZA, T. C. D. *et al.* Corn root morphoanatomy at different development stages and yield under water stress. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 51, n. 4, p. 330-339, 2016.

STUART, M. E. *et al.* A review of the impact of climate change on future nitrate concentrations in groundwater of the UK. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 409, n. 15, p. 2859-2873, 2011.

SWEET, S. K. *et al.* Anatomy of the 2016 drought in the Northeastern United States: Implications for agriculture and water resources in humid climates. **Agricultural and Forest Meteorology**, Amsterdam, v. 247, p. 571-581, 2017.

TARDIEU, F.; SIMONNEAU, T. Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modelling isohydric and anisohydric behaviours. **Journal of experimental botany**, Oxford, v. 49, p. 419-432, 1998.

TARI, I. *et al.* Response of sorghum to abiotic stresses: a review. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Germany, v. 199, n. 4, p. 264-274, 2013.

TESFAYE, K. *et al.* Potential benefits of drought and heat tolerance for adapting maize to climate change in tropical environments. **Climate Risk Management**, Amsterdam, v. 19, p. 106-119, 2018.

THOMAS, D. S. Survival and growth of drought hardened *Eucalyptus pilularis* Sm. seedlings and vegetative cuttings. **New Forests**, Netherlands, v. 38, n. 3, p. 245-259, 2009.

TORRE, F. *et al.* Leaf morphophysiological changes induced by long-term drought in *Jatropha curcas* plants explain the resilience to extreme drought. **Journal of Arid Environments**, United Kingdom, v. 185, p. 104381, 2021.

VILLAR-SALVADOR, P. *et al.* Drought tolerance and transplanting performance of holm oak (*Quercus ilex*) seedlings after drought hardening in the nursery. **Tree physiology**, United Kingdom, v. 24, n. 10, p. 1147-1155, 2004.

WHITE, J. W. *et al.* An overview of CERES–sorghum as implemented in the cropping system model version 4.5. **Agronomy Journal**, Madison, v. 107, n. 6, p. 1987-2002, 2015.

WOLDESEMAYAT, A. A. *et al.* An integrated and comparative approach towards identification, characterization and functional annotation of candidate genes for drought tolerance in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). **BMC genetics**, England, v. 18, n. 1, p. 119, 2017.

XIN, L. *et al.* Physiological and proteomic analysis of maize seedling response to water deficiency stress. **Journal of plant physiology**, Londrina, v. 228, p. 29-38, 2018.

YADAV, B. *et al.* An overview of recent advancement in phytohormones-mediated stress management and drought tolerance in crop plants. **Plant Gene**, Netherlands, p. 100264, 2021.

YAMAUCHI, T. *et al.* Aerenchyma formation in crop species: a review. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 152, p. 8-16, 2013.

YAN, W.; ZHONG, Y.; SHANGGUAN, Z. Evaluation of physiological traits of summer maize under drought stress. **Acta Agriculturae Scandinavica, Section B—Soil & Plant Science**, England, v. 66, n. 2, p. 133-140, 2016.

YANG, Z. *et al.* SbWRKY30 enhances the drought tolerance of plants and regulates a drought stress-responsive gene, SbRD19, in sorghum. **Journal of plant physiology**, Londrina, v. 246, p. 153142, 2020.

YANG, N.; YAN, J. New genomic approaches for enhancing maize genetic improvement. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 60, p. 101977, 2021.

YEPES, A.; BUCKERIDGE, M. S. Respuestas de las plantas ante los factores ambientales del cambio climático global (revisión). **Colombia forestal**, Bogotá, v. 14, n. 2, p. 213-232, 2011.

YOO, C. Y. *et al.* Regulation of transpiration to improve crop water use. **Critical Reviews in Plant Science**, London, v. 28, n. 6, p. 410-431, 2009.

YOU, J.; CHAN, Z. ROS regulation during abiotic stress responses in crop plants. **Frontiers in plant science**, Austrália, v. 6, p. 1092, 2015.

ZELITCH, I.; WAGGONER, P. E. Effect of chemical control of stomata on transpiration and photosynthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Estados Unidos, v. 48, n. 7, p. 1101, 1962.

ZHAN, A.; SCHNEIDER, H.; LYNCH, J. P. Reduced lateral root branching density improves drought tolerance in maize. **Plant physiology**, Bethesda, v. 168, n. 4, p. 1603-1615, 2015.

ZHAO, J. *et al.* Shoot and root traits in drought tolerant maize (*Zea mays* L.) hybrids. **Journal of Integrative Agriculture**, China, v. 17, p. 1093-1105, 2018.

ZHOU, H. *et al.* Capability of leaf water content and its threshold values in reflection of soil–plant water status in maize during prolonged drought. **Ecological Indicators**, Netherlands, v. 124, p. 107395, 2021.

ZONG, Y. Z.; SHANGGUAN, Z. P. Nitrogen deficiency limited the improvement of photosynthesis in maize by elevated CO₂ under drought. **Journal of Integrative Agriculture**, China, v. 13, n. 1, p. 73-81, 2014.

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

**Leaf intercellular spaces modulate the gas exchange of *Sorghum bicolor* (L.) Moench.
grown under different water levels**

PERIÓDICO

Photosynthesis Research

Abstract

This work aimed to evaluate the effects of lower water levels on leaf intercellular spaces and to assess their relations with the gas exchange, anatomy and growth of *Sorghum bicolor*. Experiments were conducted in a greenhouse, in which plants were subjected to three water conditions (ten replicates per plant): field capacity (FC), 75% FC and 50% FC. Lower water levels had no significant effect on the growth of *S. bicolor* but increased the biomass of the roots. Moreover, the number of leaves, leaf area and leaf size as well as the chlorophyll content were not affected by lower water levels, and no significant changes were detected for whole plant photosynthesis, transpiration or stomatal conductance. The water content of the plants and the water potential remained unchanged. However, compared with other treatments, the 75% FC treatment increased water loss and decreased the water content. Lower water levels increased the intercellular CO₂ content, mesophyll area and proportion of stomatal cavities and promoted minor changes in leaf tissue and stomatal traits. The increased stomatal cavities provided higher CO₂ uptake and prevented excessive water loss. Thus, modifications to the intercellular spaces promoted conditions to avoid excessive water loss while concurrently improving CO₂ uptake, which are important traits for drought-tolerant plants.

Keywords: Leaf anatomy, gas exchange, photosynthesis, stomatal cavity, transpiration, water stress.

Introduction

Lower water levels are a severe environmental condition that substantially limits crop and ecosystem productivity. To regulate their survival, growth and development, species must control water loss under drought conditions (Hsie et al. 2015). Such control in drought-tolerant plants requires morphological, anatomical and physiological modifications (Lavinsky et al. 2015; Zhao et al. 2018). These modifications include reduced leaf area and thickness, decreased stomatal density, stomatal closure, and decreased transpiration and photosynthesis (Clauw et al. 2015; Zhao et al. 2018; Anupama et al. 2019). Lower water levels-induced morphophysiological modifications occur to reduce water loss; however, they also limit photosynthesis. In fact, reduced net photosynthesis and growth are often reported in plants under drought (Hsie et al. 2015). Restricted photosynthesis may be related to reduced stomatal CO₂ uptake and diffusion within the mesophyll (Abdallah et al. 2018). These well-known responses permit plant survival but reduce productivity. In this sense, drought-tolerant species are recognized as showing minimal growth losses under lower water levels.

Sorghum bicolor (L.) Moench is usually recognized as a drought-tolerant species (Impa et al. 2019) and is often used in studies about drought-tolerance (Sutka et al. 2016; Guha et al. 2018; Impa et al. 2019). Leaves play a key role in the control of water loss since these organs are the main site for gas exchange (Hughes et al. 2017). The control of leaf gas exchange is mostly performed by stomata, whose conductance and transpiration are reduced closure (Engineer et al. 2014; Lawson and Blatt 2014). Another common response to drought stress is a reduced leaf area (Clauw et al. 2015; Zhao et al. 2018; Anupama et al. 2019). However, stomatal closure prevents CO₂ uptake, and a smaller leaf area limits photosynthesis capacity, causing significant growth limitation.

The conflicting nature of plant survival under drought conditions has promoted the use of tolerance parameters such as water-use efficiency (WUE) (Zelitch and Waggoner 1962). This index is based on the ratio between biomass production and water consumption (Kramer and Boyer 1995), and WUE is also calculated as the ratio between net photosynthesis and transpiration in gas exchange instruments (Cruz et al. 2019). Regardless of the calculation method, stomata play a key role in WUE because these structures are the main sites of gas exchange (Buckley 2019). However, anatomical analysis has often provided contrasting information in the literature regarding stomatal traits under lower water levels. For instance, drought can reduce stomatal density (Hughes et al. 2017; Anupama et al. 2019) or increase this parameter (Melo et al. 2007; Moroke et al. 2011) in tolerant species. Furthermore, the

stomatal index can increase (Hsie et al. 2015) or decrease (Silva et al. 2009) in drought-tolerant plants. Therefore, different anatomical traits may also exist for drought-tolerant plants, and the intercellular spaces may be one of the most underestimated characteristics in this sense.

Intercellular spaces are the main sites for gas diffusion within a leaf (Ni et al. 2014). Larger intercellular spaces are associated with higher CO₂ concentrations in the mesophyll, which favor an increased photosynthesis rate (Terashima et al. 2006; Gleason et al. 2019). This is very important for plants to maintain their growth under drought conditions (Lavinsky et al. 2015). It is important to note that, regardless of the stomatal control of water loss, the water vapor that leaks from these structures is produced in the intercellular spaces within the mesophyll (Jarman 1974; Terashima et al. 2006). Thus, intercellular spaces influence both photosynthesis and transpiration and may have an important role in drought-tolerance.

The hypothesis of this work is that drought-tolerant plants alter their leaf intercellular spaces to improve their capacity for water preservation and CO₂ uptake, and these changes are related to their photosynthesis, transpiration and growth capacity. Thus, this work aimed to evaluate the effects of lower water levels on leaf intercellular spaces and to assess their relation with the leaf gas exchange, anatomy and growth of *Sorghum bicolor*.

Material and methods

Plant material and experimental design

The experiment was carried out in a greenhouse located at the Universidade Federal de Lavras (UFLA), Minas Gerais, Brazil (21°13'17"S and 44°57'47"W). *Sorghum bicolor* (L.) Moench plants were obtained from seeds provided by the National Research Center for Corn and Sorghum, EMBRAPA - Sete Lagoas, MG, Brazil.

The seeds were sown in 5.0 L plastic pots containing 2.0 L of sand and 800 ml of nutrient solution (Hoagland and Arnon 1950) at 40% of its ionic force. The pots were then placed in a germination chamber under constant light at 25°C for approximately seven days, after which the seedlings had three leaves and were 10 cm in height.

Seedlings displaying good phytosanitary conditions and of similar size were individually transplanted into 5.0 L plastic pots containing 3.0 L of sand and nutrient solution (Hoagland and Arnon 1950) at 40% of its ionic force. These pots were kept in a greenhouse at 25±2°C, under 50% relative humidity and under a 12 h photoperiod.

The plants were then subjected to three water conditions according to the method used by Díaz et al. (2018). The water conditions used in the experiments were (1) field capacity (FC), (2) 75% field capacity (75% FC) and (3) 50% field capacity (50% FC). Field capacity was considered as the maximum volume of water retained by 1.0 L of sand without becoming waterlogged. The volume of water applied to achieve FC was 310.0 ml water L⁻¹ sand, and for 75% FC and 50% FC, the amounts of water in the substrate were maintained at 232.5 and 155.0 ml water L⁻¹ sand respectively. The plants remained in these conditions for 60 days. The water lost by evapotranspiration was monitored by the daily difference in the mass of each pot and then replaced and the nutrient solution was replaced weekly. The experimental design was completely randomized, with three treatments and ten replicates per plant. All the data obtained from multiple analyses were averaged for each replicate.

Plant growth analysis and water content

Plant height and the number of leaves were evaluated at 10 days intervals. The plants were sampled at the end of the experiment and then separated into leaves, stems and roots. The leaf area, length and width were measured by a CI-203 handheld area meter (CID Bio-Science, Camas, USA). Then, the fresh mass of each tissue was measured on an AY220 analytical

scale (Shimadzu, Kyoto, Japan). The roots, leaves and stems were oven dried at 60°C until a constant mass was achieved, after which the dry mass was also assessed on an analytical scale. The biomass allocation was calculated for each organ using the following equation (Santos et al. 2015): $AL\% = (ODM/PDM)*100$. Here, AL% is the biomass allocation to a given organ, ODM is the dry mass of the organ, and PDM is the whole-plant dry mass. The mass of water in each plant organ was calculated by the difference between fresh and dry masses.

All water applied to the system was measured for each replicate. The water retention in the plants was estimated using the following equation: $WR = (PWM/WEX)*100$. Here, WR is the water retention, PWM is the mass of water in the plant, and WEX is the total mass of water applied in the experiment. The water lost by evapotranspiration (EVAP) was estimated by the equation: $EVAP (\%) = 100-WR$. In addition, the water content (WC) in the plant and its organs was calculated by the: $WC = [(FM-DM)/FM]*100$, where FM is the plant/organ fresh mass and DM is its dry mass.

The leaf water potential was measured at the end of the experiment with a portable Scholander-type (Scholander et al. 1965) pressure pump (PMS Instrument Company, Corvallis, USA). Gaseous N₂ was used to apply the required pressure. Measurements were taken at dawn (between 04:00 and 06:00 a.m.) for the first fully developed leaf from the top.

Gas exchange and chlorophyll content analyses

At the end of the experiment, leaf gas exchange was assessed with an LI-6400XT model infrared gas analyzer (LI-COR Biosciences, Lincoln, USA) coupled to an LI-6400-02B cuvette with red/blue LED light source (LI-COR, Lincoln, USA). Measurements were taken for two fully developed leaves per plant from 08:00 to 10:00 a.m., with the photon flux density fixed at 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, and a mean temperature of 28.1°C; CO₂ was obtained from the atmosphere, its mean concentration was 420.1 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ air, and the pump flow was 500 $\mu\text{mol s}^{-1}$. The net photosynthesis (A), transpiration rate (E), stomatal conductance of water (g_{sw}) and CO₂ (g_{tc}), intercellular carbon concentration (Ci) and vapor pressure deficit (VPD) were assessed. The whole-plant photosynthesis (A_{wp}), whole-plant transpiration (E_{wp}) and whole-plant conductance (g_{swp}) were calculated with the following equations: $A_{wp} = A*(\text{leaf area})$; $E_{wp} = E*(\text{leaf area})$; and $g_{swp} = g_s*(\text{leaf area})$. The parameters obtained directly by the analysis of the IRGA are given in moles (CO₂ or water) per square meter per second thus, by

multiplying by the real leaf area of the plant (much lower than one square meter at the sampling age), the calculated parameters are given in moles (CO₂ or water) per second.

The chlorophyll content was estimated with a SPAD-502 chlorophyll meter (Konica-Minolta, Tokyo, Japan). The base, middle and tip of one leaf per plant were evaluated, and the transformed values of these parameters were then averaged.

Water-use efficiency (WUE)

At the end of the experiment, two types of water-use efficiency (WUE) were calculated: (1) instantaneous (WUE_i) and (2) accumulated (WUE_a) (Kramer and Boyer 1995). The WUE_i (μmol CO₂ mmol⁻¹ H₂O) was calculated as the ratio of photosynthesis (A) to transpiration (E) values obtained from the IRGA analyses. The WUE_a (mg dry-mass g⁻¹ H₂O) was calculated as the ratio of the total plant dry mass (MSt) to the total water consumed during the period (MSt/total water consumed).

Anatomical analysis

One fully developed leaf was removed and fixed in 70% ethanol (Johansen 1940). Transversal sections were generated using steel blades at the base, tip and median leaf regions. The sections were clarified with 50% sodium hypochlorite and washed twice in distilled water for 10 min. Further, the sections were stained with a safrablau solution (1% safranine and 0.1% astra blue at a proportion of 1:7) and then mounted onto slides with 50% glycerol (Johansen, 1940). Paradermal imprints (Segatto et al. 2004) were taken from both abaxial and adaxial leaf surfaces using a cyanoacrylate resin and then mounted onto slides. The paradermal imprints were taken in the morning from 6-8 a.m. when the stomata were expected to be open. The slides were imaged under a CX31 light microscope (Olympus, Tokyo, Japan). One slide per leaf was formed, three sections and four fields were analyzed for each slide, and the data were averaged for each replicate. The images were analyzed with ImageJ software (Wayne Rasband National Institutes of Health, United States of America).

The following anatomical characteristics of the transverse sections were assessed the leaf thickness, total leaf area, mesophyll area, total substomatal cavity area, total area of narrow intercellular spaces in the mesophyll, and area of vascular bundles. The percentages of substomatal cavities, narrow intercellular spaces, mesophyll cells and vascular bundles were

calculated as: $A\% = (TA/\text{total leaf area}) \times 100$, where: A% is the proportion of a given tissue and TA is the tissue area measured.

For the paradermal sections, the following structures were analyzed: section area, number of stomata, number of regular epidermal cells, stomatal pore area, number of open stomata and the number of closed stomata. The stomatal density (SD) was calculated as follows: $SD = \text{number of stomata} \times (10^6 / \text{section area})$. The stomatal index (SI) was calculated as follows: $SI = [\text{number of stomata} / (\text{number of stomata} + \text{number of regular epidermal cells})] \times 100$. The percentage of open stomata (OS) was calculated as follows: $OS = (\text{number of open stomata} / \text{total number of stomata}) \times 100$. The percentage of closed stomata (CS) was calculated as follows: $CS = 100 - OS$. The stomatal pore area per plant (SP) was calculated as follows: $SP = \text{stomatal pore area} \times \text{stomatal density} \times \text{leaf area}$, each with the same area units (square millimeters). Last, the number of stomata per plant (NSP) was calculated as follows: $NSP = \text{stomatal density} \times \text{leaf area}$, with the same area units (square millimeters).

Statistical analysis

The data were subjected to one-way ANOVA, and the means were compared by the Scott-Knott test as $p < 0.05$ or via regression analysis using SISVAR 5.0 software (Ferreira 2011). Prior to parametric analysis, the data were tested for a normality using the Shapiro-Wilk test, and all the variables showed a normal distribution.

Results

Sorghum bicolor showed the same growth pattern under all water treatments with linear increase in height over time (Fig. 1A). The number of leaves per plant also exhibited the same pattern for all treatments, increasing until the fortieth day and then decreasing (Fig. 1B). Lower water levels caused no significant differences in the leaf area, length, or the length:width ratio (Table 1).

Lower water levels caused no significant changes in the total and root dry masses (Fig. 2A); however, 50% FC reduced the leaf and stem dry masses (Fig. 2A). No significant changes in biomass allocation to the leaves and stems were found (Fig. 2B), but 50% FC increased plant biomass investment in the roots (Fig. 2B).

The water mass in the roots and leaves remained unchanged under all treatments, but 50% FC reduced this parameter in the stems (Fig. 2C). Lower water levels did not promote changes in plant water content (Fig. 2D). The 75% FC treatment increased water retention and decreased the water loss by evapotranspiration, though no significant differences were observed between the FC and 50% FC treatments (Fig. 2, E and F). The leaf water potential was not significantly altered by the treatments (Fig. 2G).

Lower water levels had no significant effects on the net photosynthesis (Fig. 3A), transpiration (Fig. 3B), stomatal conductance to water vapor (Fig. 3C) or CO₂ (Fig. 3D). Lower water levels increased the intercellular carbon concentration when compared with that under the FC treatment (Fig. 3E). Moreover, lower water levels did not affect the whole-plant photosynthesis, transpiration, stomatal conductance or the chlorophyll content of *S. bicolor* (Table 2).

Compared with that under the control, the leaf vapor pressure deficit under both 75% FC and 50% FC increased (Fig. 3F), and the atmospheric vapor pressure deficit increased proportionally with lower water levels (Fig. 3F). Lower water levels promoted no significant changes in the instantaneous WUE (Fig. 3G) or accumulated (Fig. 3H) water-use efficiency of *Sorghum bicolor* plants.

Lower water levels also had no significant effect on the leaf thickness of *Sorghum bicolor* (Fig. 4A and Fig. 5). In addition, lower water levels promoted no deformation of leaf tissues and structures as all samples showed normal leaf characteristics (Fig. 5). Lower water levels increased the mesophyll area of *S. bicolor* leaves (Fig. 4B). In addition, lower water levels increased the substomatal cavity size (Fig. 4C and Fig. 5), but no significant effects on the narrow intercellular spaces in the mesophyll were detected (Fig. 4D and Fig. 5). Lower

water levels caused no significant changes in the proportion of cells or vascular bundles in the mesophyll (Fig. 4, E and F).

Lower water levels had no significant effect on the stomatal density of *Sorghum bicolor* (Fig. 6A). However, the stomatal index decreased under both the 75% FC and 50% FC treatments on the abaxial surface and under the 50% FC treatment on the adaxial surface (Fig. 6B). Lower water levels caused no significant modifications in the total number of stomata per plant on the abaxial surface, but 50% FC reduced this parameter on the adaxial surface (Fig. 6C). The 50% FC treatment increased the number of open stomata on the abaxial surface while reducing the number of closed stomata (Fig. 6, D and E). No significant changes in the number of open or closed stomata on the adaxial leaf surface were detected (Fig. 6, D and E). The stomatal pore area and the stomatal pore area per plant were not significantly changed by lower water levels on the abaxial surface (Fig. 6, F and G); however, 50% FC treatment reduced the stomatal pore area on the adaxial surface (Fig. 6, F and G).

Table 1. Leaf morphometry data of *Sorghum bicolor* under different water levels. The data are shown as the means \pm standard deviations.

Variable	Field Capacity (FC)	75% FC	50% FC
Leaf area (cm ²)	616.47 \pm 155.5a	657.63 \pm 180.1a	547.12 \pm 182.9a
Leaf width (cm)	4.65 \pm 0.3a	4.66 \pm 0.6a	4.32 \pm 0.9a
Leaf length (cm)	42.47 \pm 6.1a	45.39 \pm 6.9a	37.44 \pm 8.9a
Leaf length:width Ratio	9.19 \pm 1.6a	9.83 \pm 1.5a	8.77 \pm 1.3a

The means followed by the same letters on the same line do not differ according to the Scott-Knott test at $p < 0.05$.

Table 2. Gas exchange parameters and chlorophyll content of *Sorghum bicolor* under different water levels. The data are shown as the means \pm standard deviations.

Variable	Field Capacity (FC)	75% FC	50% FC
A _{wp} ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ s}^{-1}$)	0.76 \pm 0.43a	0.75 \pm 0.37a	0.65 \pm 0.29a
E _{wp} ($\text{mmol H}_2\text{O s}^{-1}$)	0.05 \pm 0.03a	0.06 \pm 0.03a	0.06 \pm 0.02a
g _{swp} ($\text{mol H}_2\text{O s}^{-1}$)	0.0027 \pm 0.001a	0.0031 \pm 0.001a	0.0038 \pm 0.002a
CC (SPAD units)	34.62 \pm 2.37a	33.51 \pm 5.02a	33.80 \pm 5.46a

The means followed by the same letters on the same line do not differ according to the Scott-Knott test at $p < 0.05$. (A_{wp}) = Whole-plant photosynthesis; (E_{wp}) = Whole-plant transpiration; (CC) = Chlorophyll content; (g_{swp}) = Whole-plant stomatal conductance of water.

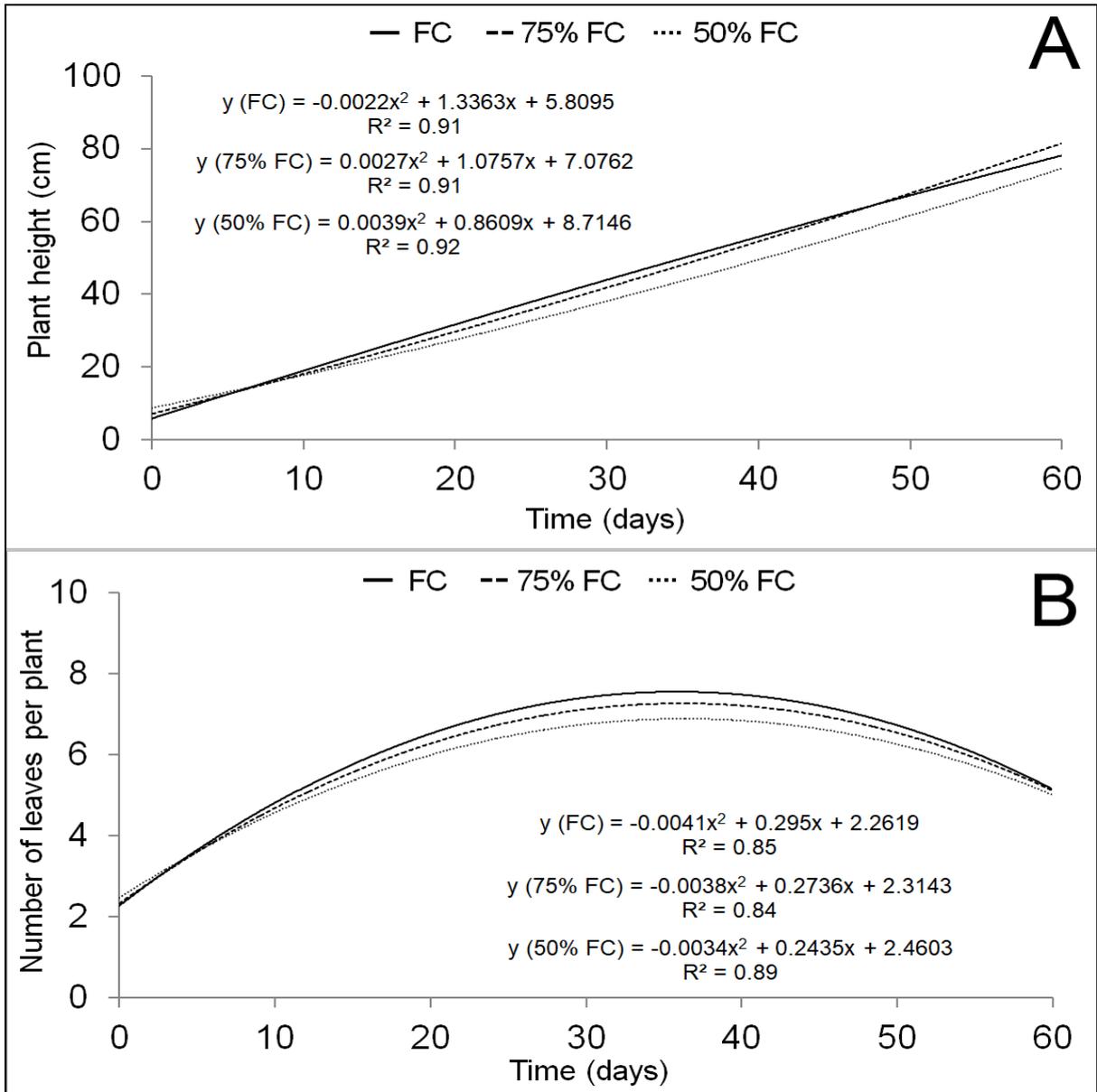


Fig. 1. Plant height and number of leaves of *Sorghum bicolor* under field capacity (FC) and under 75% and 50% FC.

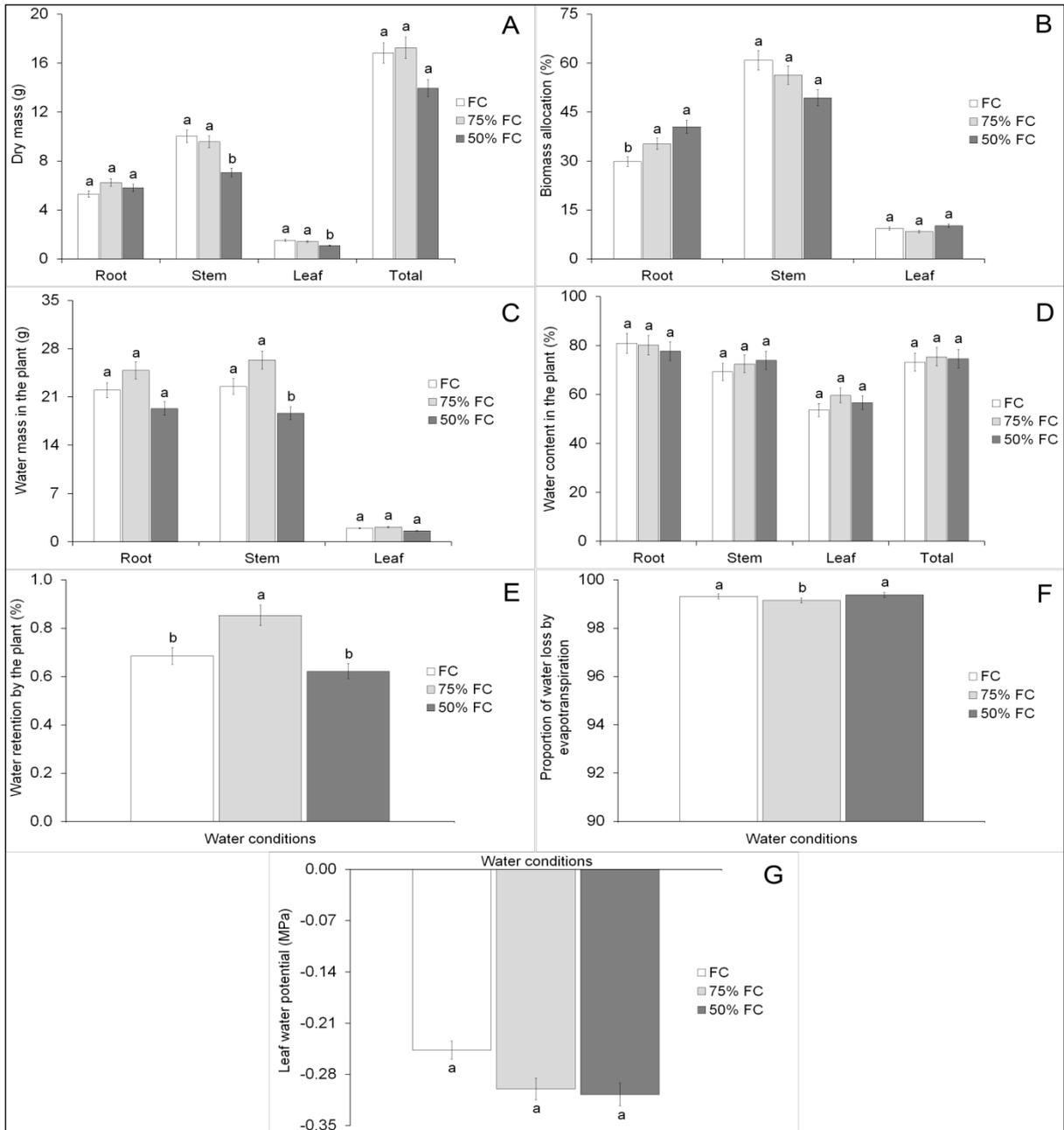


Fig. 2. Growth and water content parameters of *Sorghum bicolor* under field capacity (FC) and under 75% and 50% FC. The same letters in the columns do not differ according to the Scott-Knott test at $p < 0.05$. Bars= standard errors.

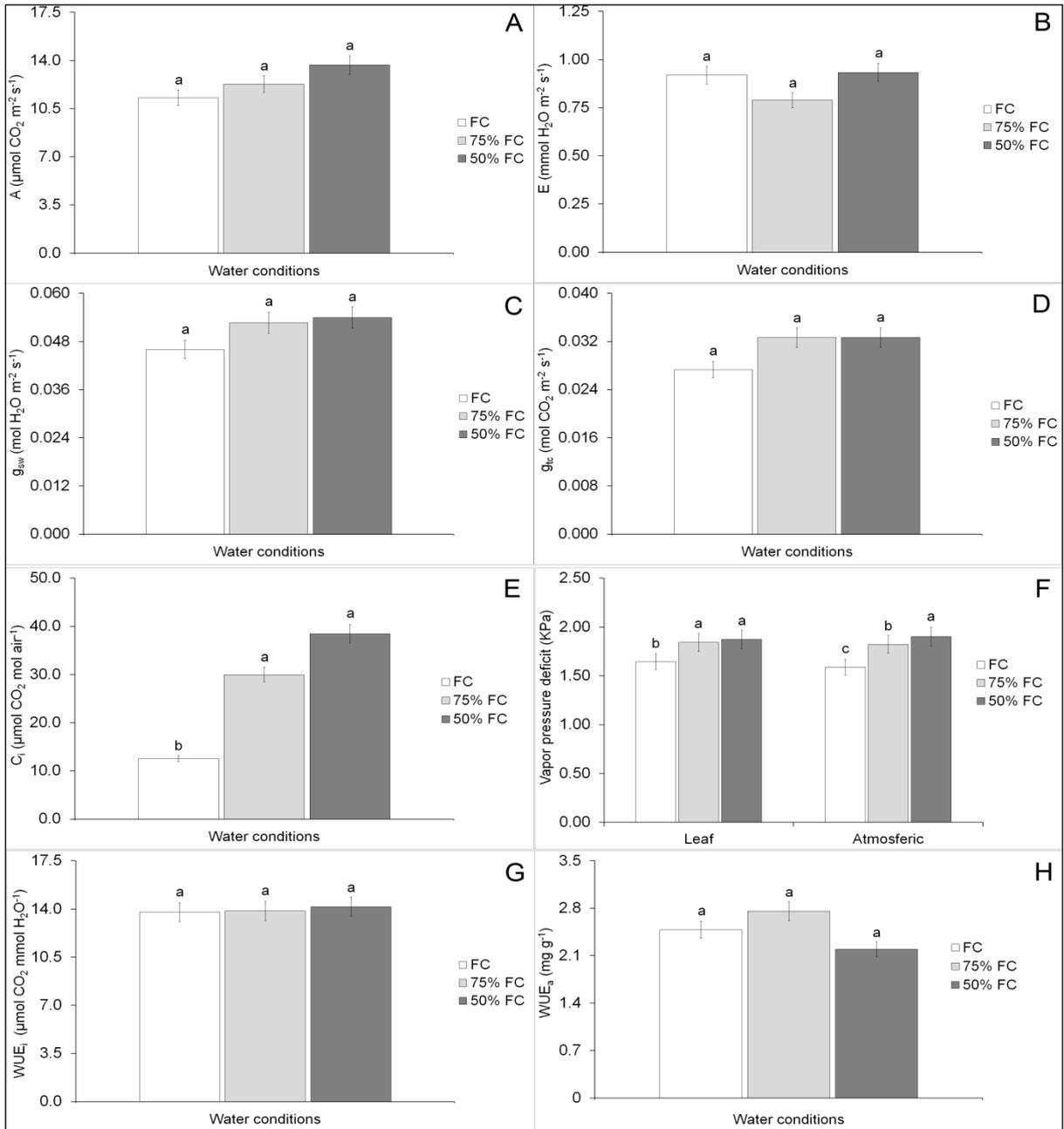


Fig. 3. Leaf gas exchange parameters of *Sorghum bicolor* under field capacity (FC) and under 75% and 50% FC. (A) = Net photosynthesis; (E) = Transpiration rate; (g_{sw})= Stomatal conductance of water vapor; (g_{tc})= Total conductance of CO₂; (C_i)= intercellular CO₂ concentration; (WUE_i)= instantaneous water-use efficiency; (WUE_a)= accumulated water-use efficiency. The same letters in the columns do not differ according to the Scott-Knott test at $p < 0.05$. Bars= standard errors.

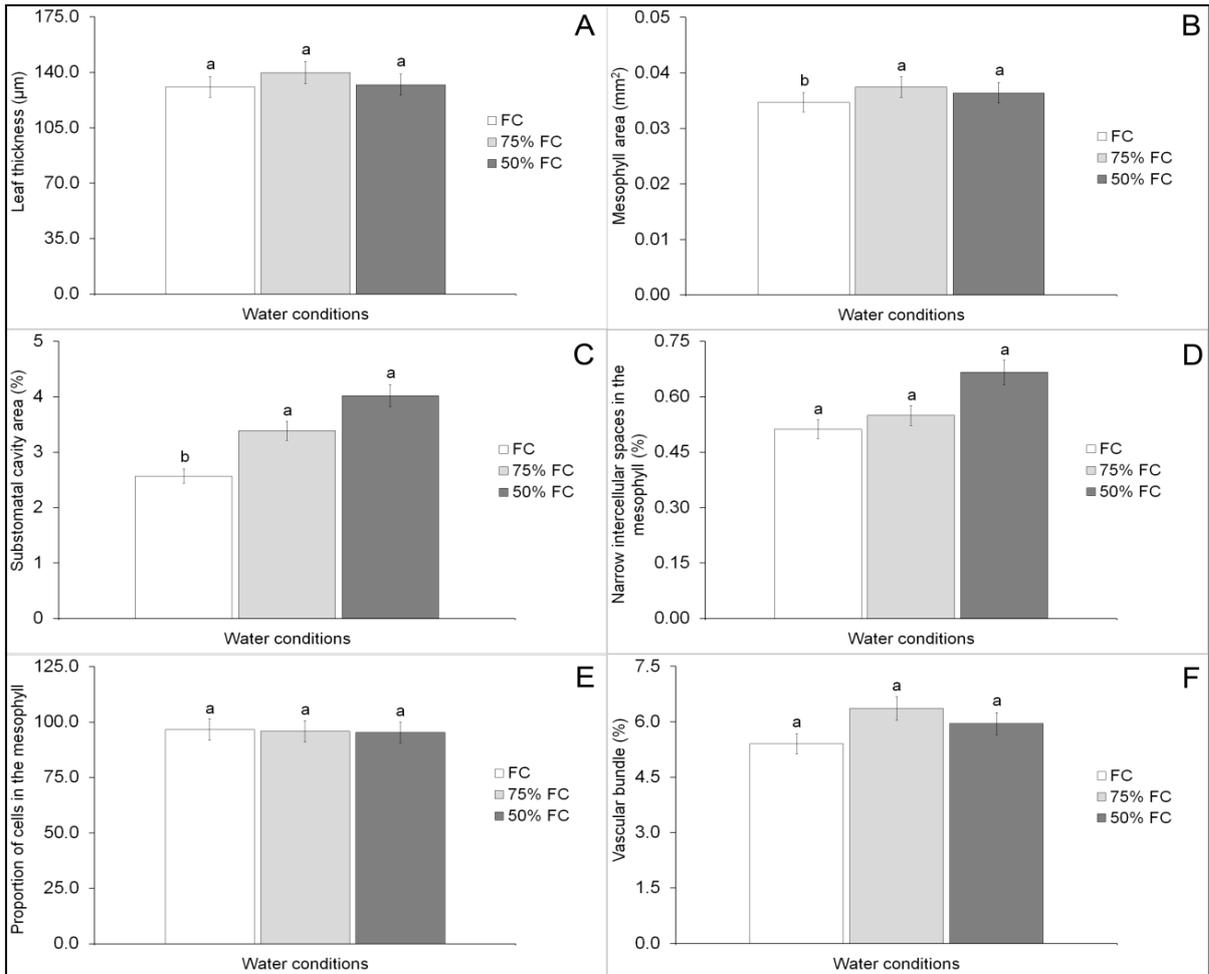


Fig. 4. Leaf anatomical characteristics of transverse sections of *Sorghum bicolor* grown under field capacity (FC) and under 75% and 50% FC. The same letters in the columns do not differ according to the Scott-Knott test at $p < 0.05$. Bars= standard errors.

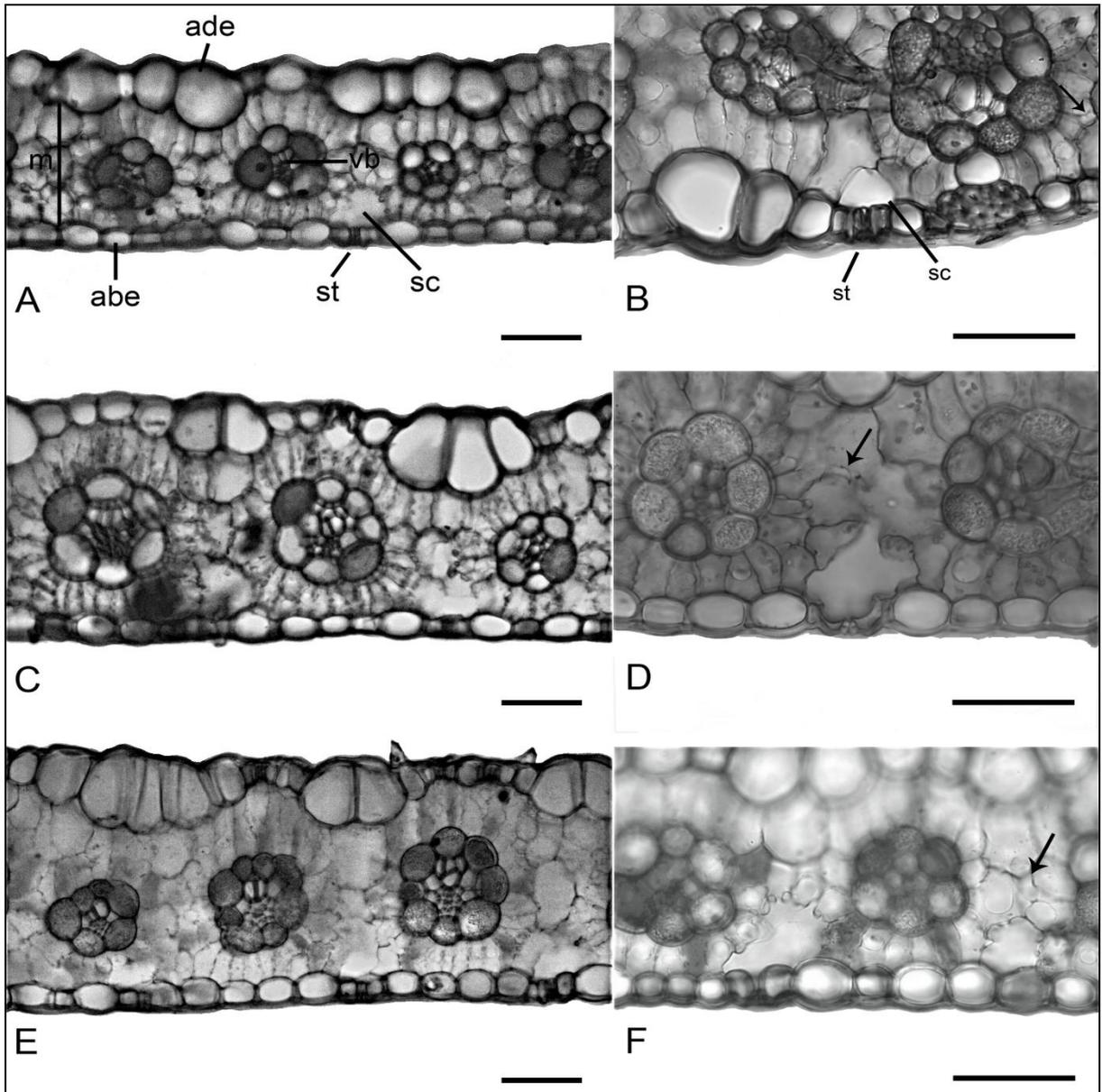


Fig. 5. Transverse sections of *Sorghum bicolor* leaves under different water conditions. A and B = field capacity (FC); C and D = 75% FC; E and F = 50% FC. ade = adaxial epidermis, abe = abaxial epidermis, m = mesophyll, vb = vascular bundle, st = stomata, sc = substomatal cavity, arrow = narrow intercellular spaces in the mesophyll. Bars = 50 μ m.

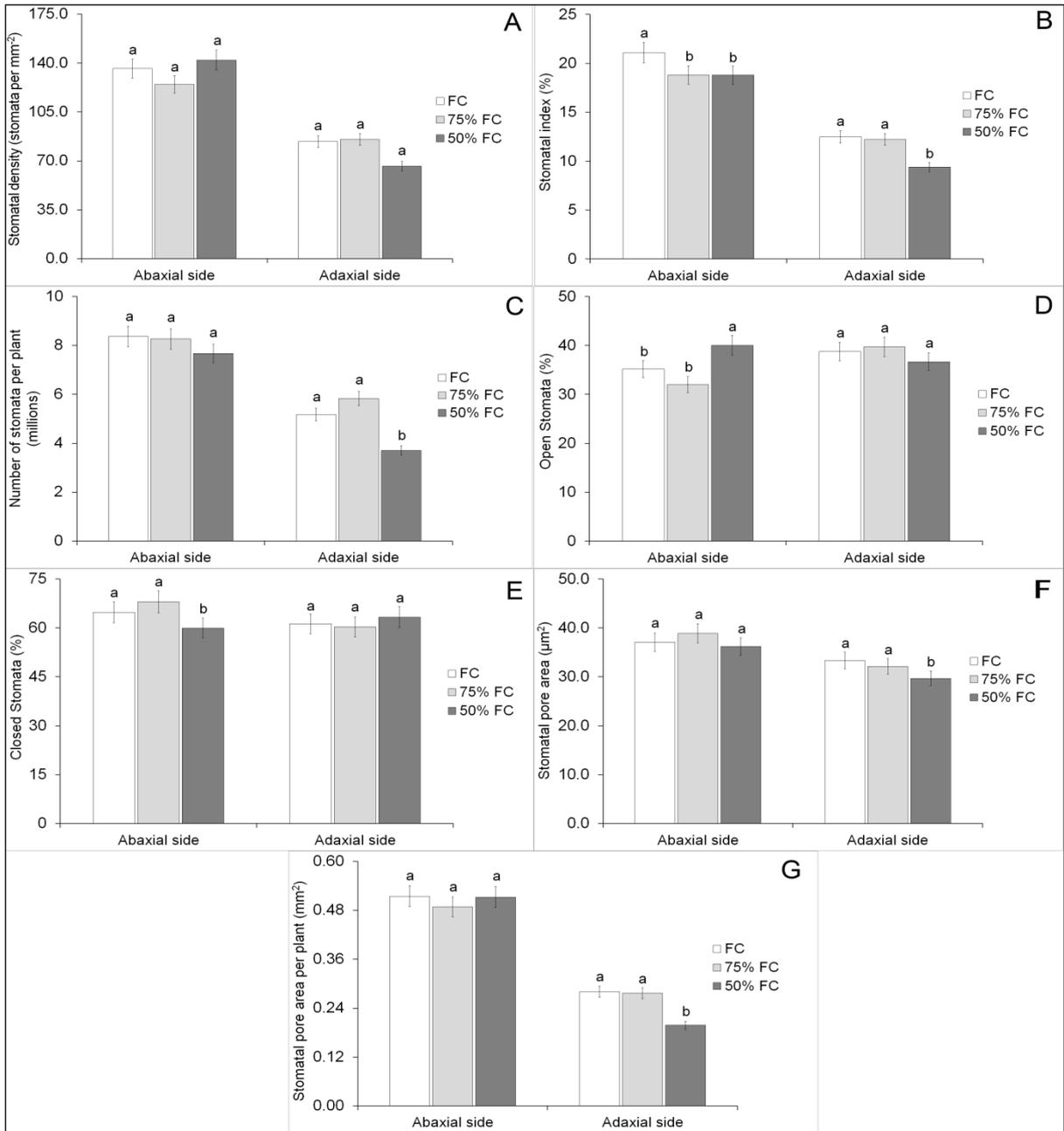


Fig. 6. Leaf anatomical characteristics of paradermal sections of *Sorghum bicolor* under field capacity (FC) and under 75% FC and 50% FC. The same letters in the columns do not differ according to the Scott-Knott test at $p < 0.05$. Bars= standard errors.

Discussion

The results obtained in this work corroborate the ability of *Sorghum bicolor* to tolerate lower water levels. The tolerance of *S. bicolor* is usually related to its ability to grow in soils with a low water potential (Sutka et al. 2016; Impa et al. 2019). In this experiment, *S. bicolor* maintained its growth and biomass production and invested more biomass in the root system. In addition, the production of biomass as a product of photosynthesis remained stable under relatively low water levels. The ability to maintain biomass production is one of the main traits of drought-tolerant plants (Lavinsky et al. 2015). The higher biomass allocation to roots than to shoots is also an important characteristic of drought-tolerance since larger roots can improve water uptake. In fact, larger root systems increase soil exploration and the capacity for water absorption (Souza et al. 2016; Zhao et al. 2018), which supports biomass production and growth under drought conditions (Gleason et al. 2019). Thus, the capacity to maintain sufficient photoassimilate production to improve root growth under lower water levels may be related to the gas exchange and leaf anatomy of *S. bicolor*, which further discussed.

The maintenance of the leaf area of *Sorghum bicolor* plants under lower water levels is an important result, as this phenomenon contributed to the maintenance of photosynthesis. In fact, a reduction in leaf area is a common response under drought to reduce transpiration (Clauw et al. 2015). However, the reduction in leaf area to avoid water loss strongly reduces whole-plant photosynthesis (Cruz et al. 2019). *Sorghum bicolor* showed the capacity to maintain whole-plant photosynthesis under lower water levels, and this result may be related to the maintained leaf area. The chlorophyll content and leaf size also remained unchanged in *S. bicolor* under lower water levels. Drought usually reduces leaf size (Chartzoulakis et al. 2002) and chlorophyll contents (Song and Jin 2020) and these modifications may decrease gas exchange (Liu et al. 2019). Therefore, the maintenance of leaf parameters and the chlorophyll content support the drought-tolerance of *S. bicolor* and may be related to whole-plant photosynthesis and transpiration parameters.

The stomatal index decreased under relatively low water levels, but no changes to the total number of stomata per plant occurred, except under 50% FC on the adaxial side of the leaves. The number of open/closed stomata was not changed except under 50% FC on the abaxial side of the leaves. The stomatal parameters of one side of the leaf surface seem to be attune to modifications to the other side in *S. bicolor*. This balanced change therefore permitted the maintenance of gas exchange parameters under lower water levels.

The maintenance of water-use efficiency is an important trait, since its increase may be related to reduced water loss or increased photosynthesis. Drought can increase the water-use efficiency of tolerant species by reducing transpiration, but it can also reduce their growth (Hsie et al. 2015). Stomatal closure reduces stomatal conductivity, lowering photosynthesis, transpiration and plant growth (He et al. 2017; Gorthi et al. 2019). Therefore, the capacity of *Sorghum bicolor* plants to maintain their water-use efficiency is related to the maintenance of gas exchange at the whole-plant level, and it is important to maintain growth under lower water levels. Since no significant differences were observed for stomatal closure, the results indicate that another drought-tolerance mechanism may be present in *S. bicolor* leaves to permit water conservation under lower water levels.

Another potentially important result to explain the maintenance of photosynthesis and growth under lower water levels is the increase in intercellular carbon concentration. The intercellular spaces in the mesophyll are directly related to the CO₂ concentration in the leaf and to photosynthesis. Lower water levels increased the substomatal cavities and the mesophyll area in *Sorghum bicolor* leaves, which may have contributed to the uptake of more CO₂, even without significant changes in other stomatal parameters. CO₂ taken up by stomata diffuses into the mesophyll through intercellular spaces (Terashima et al. 2006). The increase in size of intercellular spaces in the mesophyll is a key result of the maintenance of photosynthesis under lower water levels. In fact, water stress often limits plant carbon acquisition (Li et al. 2020), reducing growth (Earl 2002). Thus, the results show that larger intercellular spaces in the mesophyll are important for increasing the CO₂ content in the leaf, which may be beneficial for maintaining photosynthesis under lower water levels.

There are two types of intercellular spaces in the mesophyll of *Sorghum bicolor*: substomatal cavities (SCs) and narrow intercellular spaces (Nies) (Fig. 5). This is common in plants with Kranz anatomy and C₄ metabolism, such as sugarcane (Guo et al. 2019) and maize (Pengelly et al. 2011). Lower water levels increased the substomatal cavity size and proportion but did not significantly alter the proportion of narrow intercellular spaces in the mesophyll. These are important results, since stomatal traits did not significantly change in response to lower water levels. SCs are in direct contact with the stomatal pore; as such, they are the main sites of gas exchange between the mesophyll and the atmosphere. Thus, an increase in SCs provides more room for gas allocation inside the leaf, because with each stomatal opening, a large volume of CO₂ can be taken up by the organ. In addition, the mesophyll area increased under lower water levels, whereas no significant change in Nies proportion and the increased mesophyll area increased the size of the overall areas of SCs and

Nies. Increased intercellular CO₂ concentrations were detected in *S. bicolor* under lower water levels (Fig. 3). Thus, the increase in leaf intercellular spaces may have a direct effect on intercellular CO₂ concentrations. It is reasonable to assume that a larger intercellular volume is associated with the allocation of more CO₂.

The ability to take up larger volumes of CO₂ per stomatal opening is particularly important to drought-tolerance since stomatal transpiration is measured in units of time ($E = \text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$), and the more stomata that remain open, the more water is lost. This logic is supported by the diffusion rates of CO₂ (D_{cw}) compared with water (D_{wa}), which according to Jarman (1974), are $D_{\text{cw}} = 1.58 \times 10^{-5} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ and $D_{\text{wa}} = 2.47 \times 10^{-5} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. The difference between the CO₂ and water diffusion rates indicates that for each unit of time (seconds in this case), more water is lost by transpiration than by CO₂ uptake. Therefore, for drought-tolerance, it is essential that plants reduce the duration of stomatal opening, absorb sufficient amounts of CO₂ and reduce the amount of transpiration at the same time. Another particular aspect that must be emphasized is that the CO₂ saturation point is reached very quickly in C₄ plants, such as *S. bicolor*. It is well known that C₄ species achieve CO₂ saturation earlier than C₃ plants do (Monson et al. 1999; Mcausland et al. 2016; Lawson and Vialet-Chabrand 2019). Therefore, the larger leaf intercellular spaces in *S. bicolor* provide conditions for quick and efficient stomatal opening, which may be important as a mechanism of drought-tolerance. Shorter stomatal opening times may permit adequate CO₂ uptake and may reduce water loss at the same time.

The fact that larger SCs and Nies proportions permit higher CO₂ uptake and prevent water loss is supported by maintained water potential and water content in *Sorghum bicolor* plants under lower water levels (Fig. 2). The results concerning the water status of *S. bicolor* show that these plants suffered no water stress, as they maintained their tissue water content even with no significant changes in transpiration. A reduction in water potential is one of the main effects of drought on nontolerant species (Cruz et al. 2019; Ogbaga et al. 2020). The higher water retention by the plants and the overall water status under lower water levels are also likely related to increased leaf intercellular spaces and improved gas exchange in *S. bicolor* as well as the maintained water transport capacity. Vascular bundles remain unchanged by lower water levels, preventing problems associated with water transport to the shoots. In addition, the water that reached the shoots was maintained by the increased intercellular spaces and the reduction in water loss.

Another interesting result observed was the increased vapor pressure deficit (VPD) under lower water levels. It is important to note that VPD is strongly related to leaf gas

exchange (Choudhary et al. 2020), and VPD is directly related to the difference in the partial pressure of water vapor between the mesophyll and the boundary layer of the atmosphere. The higher VPD under lower water levels may be related to lower water loss through stomata in *S. bicolor* leaves; this phenomenon in turn reduced the amount of water vapor in the boundary layer and its relative humidity. According to Tesfahuney et al. (2016), the boundary layer has a higher relative humidity than do the layers of the atmosphere farthest from leaves, and a lower relative humidity in the boundary layer increases evapotranspiration. Thus, it is important to discuss how it may be possible for the stomata of *S. bicolor* to avoid water loss if no significant differences in the transpiration rate or in the anatomical parameters of these structures were observed.

The lower water loss by the stomata of *S. bicolor* leaves regardless of the transpiration rate and the number and size of the stomata may be related to modifications of the leaf intercellular spaces. Leaf water vapor is produced by evaporation from mesophyll tissues. Evaporation occurs through all leaf tissues (Buckley et al. 2017), and the epidermis is the main site of water loss. The *S. bicolor* mesophyll is formed by chlorophyll parenchyma, vascular bundles and two intercellular space types: stomatal cavities (SCs) and narrow intercellular spaces (Nies) (Fig. 5). Most of the mesophyll area contains only Nies, which are filled by water vapor from the evaporation of surrounding tissues. In addition, SCs are limited by a cell arc in their internal parts, separating the large stomatal cavity from the chlorophyll parenchyma that is located internally (Fig. 5); this cell arc from SCs has no noticeable intercellular spaces (Fig. 5). This structure suggests that it generates resistance for gas movement between the internal mesophyll parts and the substomatal cavity. According to Jarman (1974), water vapor diffusion through stomatal guard cells can be defined by equation 1:

$$D_w = dC_w/dL \quad (\text{Eq. 1})$$

Where: D_w = is the water vapor diffusion, dC_w = is the difference between the water content of the mesophyll and atmosphere, and dL = is the transverse-section length of the stomatal pore.

The Jarman (1974) equation is based on Fick's diffusion law. In this work we propose that an adaptation of this equation can be made to explain the water retention and higher intercellular CO_2 results regardless of transpiration rates under lower water levels. The equation can be adapted and as follows (equation 2):

$$D_g = dC_g/dL \quad (\text{Eq. 2})$$

Where: D_g = is the gas diffusion through the stomatal cavity cell arc (for water vapor or CO_2), dC_g = is the difference in gas concentration (water vapor or CO_2) between the stomatal cavity and the internal parts of the mesophyll, and dL = is the transverse-section length of the cell arc.

This equation implies that a thicker cell arc in the stomatal cavity increases the resistance to gas flux; however, the gas diffusion is different between water vapor and CO_2 . The gas movement between the stomatal cavity and the mesophyll must pass through very small gaps (undetectable by light microscopy) in the anticlinal walls of two adjacent cells or through the cytoplasm. These two pathways are similar to apoplastic (through the cell walls) and symplastic (through cytoplasm) water movements. This assumption indicates that water vapor faces a larger resistance than CO_2 does when passing through the stomatal cavity structure. Water vapor has polar molecules that may face large resistance when crossing the plasmatic membrane, which is nonpolar; in addition, water molecules may aggregate because of their cohesion properties. However, CO_2 molecules are nonpolar and face little resistance from cell membranes, and their movement is much easier through both cell walls and cell membranes.

Equation 2 also describes the gas flux based on the difference in concentration between two compartments. According to Fick's law, flux occurs from higher to lower concentrations. Therefore, CO_2 movement occurs from the stomatal cavity to the inner parts of the mesophyll, since the chlorenchyma cells consume this gas from Nies, and the stomatal cavities present higher levels of this gas. The water vapor, on the other hand, moves from the Nies in the mesophyll to the stomatal cavity. Therefore, the increase in the SCs proportion increases the source of CO_2 , favoring the movement of this gas to the mesophyll and resulting in higher C_i concentrations, as shown Figure 3. Moreover, the unchanged Nies proportion may constrain water movement from the inner parts of the mesophyll to the stomatal cavity. This is a novel interpretation of the role of intercellular spaces in drought-tolerant species and how investment in different types of structures averts water loss while favoring CO_2 uptake at the same time.

Stomatal parameters showed minor variations that seemed to compensate for the modifications between the two leaf surfaces. The main parameters, such as the stomatal density, total number of stomata, stomatal pore area, and number of closed stomata, were not significantly altered or had some degree of compensation. The absence of significant stomatal

variations may be related to the unchanged gas exchange parameters at the whole-plant level. Several plant species show reduced stomatal density and a lower number of open stomata under lower water levels (Sutka et al. 2016; Hughes et al. 2017; Anupama et al. 2019). However, a reduction in stomatal parameters may limit CO₂ acquisition, photosynthesis and growth. These plants survive lower water levels but have limited productivity. *Sorghum bicolor* showed few stomatal and gas exchange adaptations but was still capable of maintaining its water content and thriving under lower water levels. Plants that evolved in dry climates usually have a large number of stomata, which is commonly associated with an advantage, as stomata can remain open for shorter times, which reduces water loss (Melo et al. 2007; Moroke et al. 2011; Cruz et al. 2019). As a xerophytic C₄ species, *Sorghum bicolor* has a large number of stomata (Fig. 6), and its stomatal structure and distribution are naturally adequate for survival during lower water levels. Therefore, when subjected to lower water levels, it is expected that additional detailed leaf alterations may occur, and the modifications of intercellular spaces presented in this work represent one of these fine adjustments.

Various results can occur from studies concerning drought-tolerant species when only stomata are evaluated, and there are species where these structures increase in number under drought (Melo et al. 2007; Moroke et al. 2011) and other studies where stomatal density or number are reduced by lower water levels (Sutka et al. 2016; Hughes et al. 2017; Anupama et al. 2019). In species such as *Sorghum bicolor* the presence of a large number of stomata evolved throughout their natural evolutionary history, and fine anatomical adjustments such as modifications to the leaf intercellular spaces also seem to be effective increasing drought-tolerance.

Conclusions

Therefore, lower water levels increases intercellular spaces in the leaves, improving their capacity to preserve water while increasing the plant capacity to take up CO₂. Lower water levels increases the proportion of stomatal cavity, and these structures modulate CO₂ and water vapor movements within the leaf. Modifications in leaf intercellular spaces are essential for the drought-tolerance of species that already have optimal stomatal numbers and structures, such as *S. bicolor*.

References

- Abdallah MB, Trupiano D, Polzella A, Zio E, Sassi M, Scaloni A, Scippa GS (2018) Unraveling physiological, biochemical and molecular mechanisms involved in olive (*Olea europaea* L. cv. *Chétoui*) tolerance to drought and salt stresses. *J Plant Physiol* 220: 83-95. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.10.009>
- Anupama A, Bhugra S, Lall B, Chaudhury S, Chugh A (2019) Morphological, transcriptomic and proteomic responses of contrasting rice genotypes towards drought stress. *Environ Exp Bot* 166: 103795. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.06.008>
- Buckley TN, John GP, Scoffoni C, Sack L (2017) The sites of evaporation within leaves. *Plant Physiol* 173: 1763-1782. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01605>
- Buckley TN (2019) How do stomata respond to water status? *New Phytol* 224: 21-36. <https://doi.org/10.1111/nph.15899>
- Chartzoulakis K, Patakas A, Kofidis G, Bosabalidis A, Nastou A (2002) Water stress affects leaf anatomy, gas exchange, water relations and growth of two avocado cultivars. *Sci Hort* 95: 39-50. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(02\)00016-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(02)00016-X)
- Choudhary S, Guha A, Kholova J, Pandravada A, Messina CD, Cooper M, Vadez V (2020) Maize, sorghum, and pearl millet have highly contrasting species strategies to adapt to water stress and climate change-like conditions. *Plant Sci* 295: 110297. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110297>
- Clauw P, Coppens F, Beuf K, Dhondt S, Van Daele T, Maleux K, Inzé D (2015) Leaf responses to mild drought stress in natural variants of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 167: 800-816. <https://doi.org/10.1104/pp.114.254284>
- Cruz YC, Scarpa ALM, Pereira MP, Castro EM, Pereira FJ (2019) Growth of *Typha domingensis* as related to leaf physiological and anatomical modifications under drought conditions. *Acta Physiol Plant* 41: 64. <https://doi.org/10.1007/s11738-019-2858-1>
- Díaz AS, Aguiar GM, Pereira MP, Castro EM, Magalhães PC, Pereira FJ (2018) Aerenchyma development in different root zones of maize genotypes under water limitation and different phosphorus nutrition. *Biol Plant* 62: 561-568. <https://doi.org/10.1007/s10535-018-0773-8>
- Earl HJ (2002) Stomatal and non-stomatal restrictions to carbon assimilation in soybean (*Glycine max*) lines differing in water use efficiency. *Environ Exp Bot* 48: 237-246. [https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(02\)00041-2](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(02)00041-2)
- Engineer CB, Ghassemian M, Anderson JC, Peck SC, Hu H, Schroeder JI (2014) Carbonic anhydrases, EPF2 and a novel protease mediate CO₂ control of stomatal development. *Nature* 513: 246-250. <https://doi.org/10.1038/nature13452>
- Ferreira DF (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciênc. agrotec.* 35: 1039-1042. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>
- Gleason SM, Cooper M, Wiggans DR, Bliss CA, Romay MC, Gore MA, Mickelbart MV, Topp CN, Zhang H, DeJonge KC, Comas LH (2019) Stomatal conductance, xylem water transport, and root traits underpin improved performance under drought and well-watered conditions across a diverse panel of maize inbred lines. *Field Crops Res* 234: 119-128. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2019.02.001>
- Gorthi A, Volenec JJ, Welp LR (2019) Stomatal response in soybean during drought improves leaf-scale and field-scale water use efficiencies. *Agric For Meteorol* 276: 107629. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2019.107629>
- Guha A, Chhajed SS, Choudhary S, Sunny R, Jansen S, Barua D (2018) Hydraulic anatomy affects genotypic variation in plant water use and shows differential organ specific plasticity to drought in *Sorghum bicolor*. *Environ Exp Bot* 156: 25-37. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.08.025>

- Guo Y, Hu M, Liu LL, Yao W, Zhang MQ (2019) Activities of key enzymes in the C4 pathway and anatomy of sugarcane infected by *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. *J Appl Microbiol* 127: 1790-1800. <https://doi.org/10.1111/jam.14444>
- He J, Du YL, Wang T, Turner NC, Yang RP, Jin Y, Xi Y, Zhang C, Cui T, Fang XW, Li FM (2017) Conserved water use improves the yield performance of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) under drought. *Agric Water Manag* 179: 236-245. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2016.07.008>
- Hsie BS, Mendes KR, Antunes WC, Endres L, Campos MLO, Souza FC, Santos ND, Singh B, Arruda ECP, Pompelli MF (2015) *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) modulates stomatal traits in response to leaf-to-air vapor pressure deficit. *Biomass and Bioenergy* 81: 273-281. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.07.014>
- Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water-culture method for growing plants without soil. *Calif Agric Exp Stn* 347: 1-34.
- Hughes J, Hepworth C, Dutton C, Dunn JA, Hunt L, Stephens J, Waugh R, Cameron DD, Gray JE (2017) Reducing stomatal density in barley improves drought tolerance without impacting on yield. *Plant Physiol* 174: 776-787. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01844>
- Impa SM, Perumal R, Bean SR, Sunoj VJ, Jagadish SK (2019) Water deficit and heat stress induced alterations in grain physico-chemical characteristics and micronutrient composition in field grown grain sorghum. *J Cereal Sci* 86: 124-131. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2019.01.013>
- Jarman PD (1974) The diffusion of carbon dioxide and water vapour through stomata. *J Exp Bot* 25: 927-936. <https://doi.org/10.1093/jxb/25.5.927>
- Johansen DA (1940) *Plant microtechnique*. McGraw-Hill, New York.
- Kramer PJ, Boyer JS (1995) *Water relations of plants and soils*. Academic press: San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo and Toronto. <https://udspace.udel.edu/handle/19716/2830>
- Lawson T, Blatt MR (2014) Stomatal size, speed, and responsiveness impact on photosynthesis and water use efficiency. *Plant Physiol* 164: 1556-1570. <https://doi.org/10.1104/pp.114.237107>
- Lavinsky AO, Magalhães PC, Ávila RG, Diniz MM, Souza TC (2015) Partitioning between primary and secondary metabolism of carbon allocated to roots in four maize genotypes under water deficit and its effects on productivity. *Crop J* 3: 379-386. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2015.04.008>
- Lawson T, Vialet-Chabrand S (2019) Speedy stomata, photosynthesis and plant water use efficiency. *New Phytol* 221, 93-98. <https://doi.org/10.1111/nph.15330>
- Li X, Shi W, Broughton K, Smith R, Sharwood R, Payton P, Tissue DT (2020) Impacts of growth temperature, water deficit and heatwaves on carbon assimilation and growth of cotton plants (*Gossypium hirsutum* L.). *Environ Exp Bot* 179: 104204. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104204>
- Liu B, Liang J, Tang G, Wang X, Liu F, Zhao D (2019) Drought stress affects on growth, water use efficiency, gas exchange and chlorophyll fluorescence of *Juglans* rootstocks. *Sci Hort* 250: 230-235. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.02.056>
- Melo HC, Castro EM, Soares ÂM, Melo LA, Alves JD (2007) Alterações anatômicas e fisiológicas em *Setaria anceps* Stapf ex Massey e *Paspalum paniculatum* L. sob condições de déficit hídrico. *Hoehnea* 34: 145-153. <http://dx.doi.org/10.1590/S2236-89062007000200003>
- Mcausland L, Vialet-Chabrand S, Davey P, Baker NR, Brendel O, Lawson T (2016) Effects of kinetics of light-induced stomatal responses on photosynthesis and water-use efficiency. *New Phytol* 211: 1209-1220. <https://doi.org/10.1111/nph.14000>
- Monson RK (1999) The origins of C4 genes and evolutionary pattern in the C4 metabolic phenotype. *C4 Plant biology USA: Academic Press*, 377– 410.

- Moroke TS, Schwartz RC, Brown KW, Juo ASR (2011) Water use efficiency of dryland cowpea, sorghum and sunflower under reduced tillage. *Soil Tillage Res* 112: 76-84. <https://doi.org/10.1016/j.still.2010.11.008>
- Ni XL, Meng Y, Zheng SS, Liu WZ (2014) Programmed cell death during aerenchyma formation in *Typha angustifolia* leaves. *Aquat Bot* 113: 8-18. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2013.10.004>
- Ogbaga CC, Amir M, Bano H, Chater CC, Jellason NP (2020) Clarity on frequently asked questions about drought measurements in plant physiology. *Scientific African* 8: e00405. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00405>
- Pengelly JJL, Kwasny S, Bala S, Evans JR, Voznesenskaya EV, Koteyeva NK, Edwards GE, Furbank RT, Von Caemmerer S (2011) Functional Analysis of Corn Husk Photosynthesis. *Plant Physiol* 156: 503–513. <https://doi.org/10.1104/pp.111.176495>
- Santos KR, Pereira MP, Ferreira ACG, Almeida Rodrigues LC, Castro EM, Corrêa FF, Pereira FJ (2015) *Typha domingensis* Pers. Growth responses to leaf anatomy and photosynthesis as influenced by phosphorus. *Aquat Bot* 122: 47-53. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2015.01.007>
- Scholander PF, Bradstreet ED, Hemmingen EA, Hammel HT (1965) Sap pressure in vascular plants: negative hydrostatic pressure can be measured in plants. *Sci* 148: 339-148. <https://doi.org/10.1126/science.148.3668.339>
- Segatto FB, Bisognin DA, Benedetti M, Costa LC, Rampelotto MV, Nicoloso FT (2004) A technique for the anatomical study of potato leaf epidermis. *Cienc Rural* 34: 1597-1601. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782004000500042>
- Silva EC, Nogueira RJ, Vale FH, Araújo FPD, Pimenta MA (2009) Stomatal changes induced by intermittent drought in four umbu tree genotypes. *Braz J Plant Physiol* 21: 33-42. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202009000100005>
- Souza TC, Magalhães PC, Castro EM, Duarte VP, Lavinsky AO (2016) Corn root morphoanatomy at different development stages and yield under water stress. *Pesq Agropec Bras* 51: 330-339. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016000400005>
- Song L, Jin J (2020) Improving CERES-Maize for simulating maize growth and yield under water stress conditions. *Eur J Agron* 117: 126072. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2020.126072>
- Sutka MR, Manzur ME, Vitali VA, Micheletto S, Amodeo G (2016) Evidence for the involvement of hydraulic root or shoot adjustments as mechanisms underlying water deficit tolerance in two *Sorghum bicolor* genotypes. *J Plant Physiol* 192: 13-20. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.01.002>
- Terashima I, Hanba YT, Tazoe Y, Vyas P, Yano S (2006) Irradiance and phenotype: comparative eco-development of sun and shade leaves in relation to photosynthetic CO₂ diffusion. *J Exp Bot* 57: 343-354. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj014>
- Tesfahuney WA, Walker S, Van Rensburg LD, Steyn AS (2016) Micrometeorological measurements and vapour pressure deficit relations under in-field rainwater harvesting. *Phys Chem* 94: 196-206. <https://doi.org/10.1016/j.pce.2016.03.001>
- Zelitch I, Waggoner PE (1962) Effect of chemical control of stomata on transpiration and photosynthesis. *Proc Natl Acad Sci* 48: 1101. <https://doi.org/10.1073/pnas.48.7.1101>
- Zhao J, Xue QW, Jessup KE, Hou XB, Hao BZ, Marek TH, Xu WW, Evett SR, Shaughnessy SAO, Brauer DK (2018) Shoot and root traits in drought tolerant maize (*Zea mays* L.) hybrids. *J Integr Agric* 17: 1093-1105. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61869-0](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61869-0)

ARTIGO 2

**A ÁREA FOLIAR E SUA INFLUÊNCIA NAS RESPOSTAS MORFOFISIOLÓGICAS
EM PLANTAS DE *Zea mays* L. (POACEAE) EM CONDIÇÕES DE SECA**

RESUMO

A seca é um dos fatores abióticos que mais interferem no crescimento e desenvolvimento das plantas de milho. A folha, por ser um órgão que apresenta grande plasticidade, é estudada como uma indicadora às mudanças ambientais. Assim, objetivou-se avaliar os efeitos da seca na área foliar e sua influência no crescimento, trocas gasosas e anatomia foliar de *Zea mays* L. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação com temperatura controlada submetendo as plantas a três condições de água (dez repetições por planta): capacidade de campo (CC), 75% CC e 50% CC. A seca afetou a massa seca dos órgãos vegetativos diminuindo o crescimento da planta. Apesar disso, houve a manutenção na alocação de biomassa na raiz, caule e folha indicando ausência de deformidade. Isso auxiliou o potencial hídrico que permaneceu inalterado mantendo a pressão parcial de água. Além disso, o número de folhas, a largura foliar, a espessura foliar e a área do mesofilo foram reduzidos pela seca. Isso promoveu a diminuição na área foliar. Nenhuma mudança significativa foi detectada nas trocas gasosas por unidade de área; no entanto, houve redução destes parâmetros na planta inteira em condições de seca. A seca reduziu a retenção de água, o que aumentou a evapotranspiração. O déficit hídrico causou alterações nas características estomáticas: reduziu o índice estomático na face adaxial, o número total de estômatos em ambas as faces e a área do poro estomático na face abaxial. Portanto, a redução da área foliar causou a diminuição destes parâmetros. Isso afetou o crescimento. Apesar disso, não havendo taxa de mortalidade este mecanismo pode ser considerado como estratégia para evitar as condições de seca no milho.

Palavras-chave: Estresse hídrico. Expansão foliar. Anatomia foliar. Massa seca.

1 INTRODUÇÃO

A produtividade agrícola é crucial nos países em desenvolvimento, principalmente na alimentação. O milho é considerado cultura básica mais importante do mundo; no entanto, a seca vem prejudicando sua produtividade (SONG et al., 2018). A seca é um fator de estresse para as plantas, pois a água é essencial ao crescimento, rendimento e a manutenção dos processos fisiológicos e o déficit hídrico em plantas sensíveis, como o milho, reduz significativamente a altura, o ganho de biomassa, a taxa fotossintética e o teor de água (CAI et al., 2020; COWAN et al., 2020). Além disso, pode modificar a alocação de massa seca nos diferentes órgãos vegetativos (ZHOU et al., 2020). Em virtude dos efeitos negativos causados pelo déficit hídrico, as plantas modificam as características anatômicas e fisiológicas para sobreviver nestas condições.

O déficit hídrico causa alterações nas características anatômicas e fisiológicas das plantas; e a área foliar merece destaque. A área foliar é considerada um fator limitante e a sua redução causa diminuição no crescimento das plantas em condições de seca (ANYIA; HERZOG, 2004; HSIE et al., 2015; WIDURI et al., 2020). Isso pode estar relacionado com a conservação de água. A resposta comum das plantas diante da seca é reduzir a área foliar, pois permite a redução da transpiração e o aumento da eficiência no uso da água (HSIE et al., 2015; WYKA et al., 2019). Além disso, o déficit hídrico aumenta a ocorrência de senescência e abscisão das folhas, o que influencia na redução da área foliar. A baixa pressão de turgor causa uma redução no número de folhas e na área foliar (ZIA et al., 2021). Portanto, nota-se que a área foliar modula respostas de crescimento nas plantas relacionadas com a preservação de água em condições de seca.

A seca causa alterações no mesofilo o que influencia na expansão foliar. Em plantas de cevada (*Hordeum vulgare* L.) houve redução da espessura do mesofilo em folhas produzidas durante a seca (WYKA et al., 2019). Isso pode estar relacionado com as atividades meristemáticas das folhas, uma vez que a escassez de água inibe o alongamento celular afetando a divisão, o que limita o crescimento das folhas (AVRAMOVA et al., 2015; NONAMI, 1998). A área foliar pode promover uma diminuição na quantidade de estômatos nas folhas e também reduz a área fotossinteticamente ativa disponível o que causa limitação nas trocas gasosas afetando o ganho de biomassa e o crescimento das plantas em condições de seca. De fato, o ajuste estomático e a redução da área foliar são estratégias comuns para evitar o déficit hídrico (ANYIA; HERZOG, 2004). Além disso, a restrição estomática pode afetar diretamente as trocas gasosas (CAI et al., 2020). Portanto, diminuindo a expansão foliar

ocasiona redução na quantidade de estômatos nas folhas. Isso pode limitar as trocas gasosas e o crescimento das plantas.

Vários trabalhos demonstram que a seca promove redução no crescimento (ANYIA; HERZOG, 2004; DJAMAN et al., 2013; HSIE et al., 2015; SONG et al., 2018; ZHOU et al., 2020). Além disso, a diminuição do crescimento causa uma redução na produtividade vegetal (DJAMAN et al., 2013; SONG et al., 2018). A redução no crescimento das plantas normalmente é relacionada com a taxa fotossintética por unidade de área (LIU et al., 2019). Apesar disso, observa-se que não há destaque da área foliar como modulador das respostas fotossintéticas para a planta inteira. A interpretação da área foliar pode auxiliar nos resultados contrastantes entre o crescimento e a taxa fotossintética por unidade de área, uma vez que o déficit hídrico causa redução no crescimento e na taxa fotossintética (LIU et al., 2019) ou pode ocorrer apenas a redução no crescimento sem alteração na taxa fotossintética. Isso é corroborado por Sapeta et al. (2013) em uma seca leve a moderada. Neste contexto, existem plantas que diminuem o seu crescimento na seca, mas mantêm a taxa fotossintética por unidade de área. Portanto, a análise da área foliar é extremamente importante. Isso vai permitir ajustar alguns parâmetros de trocas gasosas que são calculados de maneira pontual e obter parâmetros para uma situação mais real.

A literatura demonstra que área foliar possui relação com o crescimento da planta. Além disso, ao relacionar a área foliar com parâmetros de trocas gasosas é essencial para obter cálculos mais reais, uma vez que a seca pode reduzir o crescimento das plantas mantendo ou diminuindo a fotossíntese por unidade de área. Portanto, a área foliar pode afetar o crescimento em condições de seca, visto que há contrastes na interpretação na taxa fotossintética por unidade de área. Além disso, o crescimento das plantas também pode estar sendo influenciada por mudanças estomáticas, pois reduzindo o número de estômatos pode limitar as trocas gasosas das folhas. Este mecanismo pode estar relacionado com a área foliar.

Dessa forma, a hipótese deste trabalho é que a área foliar influencia nas características estomáticas foliares e nas trocas gasosas da planta modulando o crescimento em condições de seca. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento, área foliar, trocas gasosas e anatomia foliar de *Zea mays* L. em condições de seca.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e projeto experimental

O experimento foi conduzido em casa de vegetação localizada na Universidade Federal de Lavras (UFLA), estado de Minas Gerais, Brasil (21°13'17" S e 44°57'47" W). As plantas de *Zea mays* L. foram obtidas a partir de sementes disponibilizadas pelo Centro Nacional de Pesquisas de Milho e Sorgo, EMBRAPA - Sete Lagoas, MG, Brasil.

As sementes foram semeadas em vasos plásticos de 5,0 L contendo 2,0 L de areia e 800 mL de solução nutritiva (HOAGLAND; ARNON, 1950) a 40% da força iônica. Posteriormente, os vasos foram colocados em uma câmara de germinação com luz constante a 25°C por aproximadamente sete dias, até as mudas atingirem três folhas e 10 cm de altura.

Mudas em boas condições fitossanitárias e de tamanhos semelhantes foram transplantadas, individualmente, para vasos plásticos de 5,0 L contendo 3,0 L de areia e solução nutritiva (HOAGLAND; ARNON, 1950) a 40% da força iônica. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação sob 25±2 °C, com umidade relativa de 50% e fotoperíodo de 12 horas.

As plantas foram submetidas a três condições hídricas de acordo com o método utilizado por Díaz et al. (2018). As condições da água usadas nos experimentos foram (1) capacidade de campo (CC), (2) 75% da capacidade de campo (75% CC) e (3) 50% da capacidade de campo (50% CC). A capacidade de campo foi considerada como o volume máximo de água retida por 1,0 L de areia sem ficar alagado. O volume de água aplicado para atingir CC foi 310,0 ml água L⁻¹ e para 75% CC e 50% CC as quantidades de água no substrato foram mantidas em 232,5 e 155,0 ml água L⁻¹, respectivamente. As plantas permaneceram nessas condições por 60 dias. A perda de água por evapotranspiração foi monitorada pela diferença diária na massa de cada vaso e depois repostas; e a solução nutritiva foi substituída semanalmente. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três tratamentos e dez repetições de uma planta. Todos os dados obtidos de análises múltiplas foram calculados para cada réplica.

2.2 Análise de crescimento vegetal e teor de água

A altura das plantas e o número de folhas foram avaliados em intervalos de 10 dias. As plantas foram amostradas ao final do experimento e, posteriormente, separadas em folhas,

caules e raízes. A área, comprimento e largura foliar foram medidos utilizando um medidor de área portátil CI-203 (CID Bio-science, Camas, EUA). Em seguida, a massa fresca de cada parte da planta foi medida em uma balança analítica AY220 (Shimadzu, Kyoto, Japão). As raízes, folhas e caules foram secos em estufa a 60 °C até a obtenção de massa constante. Após, foram pesadas em uma balança analítica. A alocação de biomassa foi calculada para cada órgão vegetativo usando a seguinte equação proposta por Santos et al. (2015): $AL\% = (ODM / PDM) * 100$. Aqui, AL% é a alocação de biomassa para um determinado órgão, ODM é a massa seca do órgão e PDM é a massa seca da planta inteira. A massa de água em cada órgão da planta foi calculada pela diferença entre a massa fresca e a massa seca.

Toda a água aplicada no experimento foi contabilizada para cada repetição. A retenção de água nas plantas foi estimada usando a seguinte equação: $WR = (PWM / WEX) * 100$, onde WR é a retenção de água, PWM é a massa de água na planta e WEX é a massa total de água aplicada no experimento. A perda de água por evapotranspiração (EVAP) foi estimada pela equação: $EVAP (\%) = 100 - WR$.

O potencial hídrico foliar foi medido no final do experimento com uma bomba de pressão portátil do tipo Scholander (SCHOLANDER et al., 1965) (PMS Instrument Company, Corvallis, EUA). Nitrogênio (N₂) gasoso foi usado para aplicar a pressão necessária. As medições foram feitas ao amanhecer (entre 04h00 e 06h00) na primeira folha totalmente desenvolvida a partir do ápice.

2.3 Análise de trocas gasosas e conteúdo de clorofila

Ao final do experimento, as trocas gasosas foliares foram avaliadas com um analisador de gás infravermelho modelo LI-6400XT (Li-COR Biosciences, Lincoln, EUA) acoplado a uma câmera LI-6400-02B com fonte de luz LED vermelha / azul (LiCor, Lincoln, EUA). As medições foram feitas em duas folhas totalmente desenvolvidas por planta das 08h00 às 10h00 da manhã. A densidade do fluxo de fótons foi fixada em 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e a vazão da bomba de 500 $\mu\text{mol s}^{-1}$; a temperatura média foi de 28,1°C. Foram avaliadas a fotossíntese líquida (A), a taxa de transpiração (E), a condutância estomática para a água (g_{sw}) e CO₂ (g_{tc}). A fotossíntese da planta inteira (A_{wp}), a transpiração da planta inteira (E_{wp}) e a condutância da planta inteira (g_{swp}) foram calculadas com as seguintes equações: $A_{wp} = A * (\text{área foliar})$; $E_{wp} = E * (\text{área foliar})$ e $g_{swp} = g_s * (\text{área foliar})$. Os parâmetros obtidos diretamente pela análise pontual no IRGA são dados em moles (CO₂ ou água) por metro quadrado por segundo,

portanto, multiplicando-se pela área foliar real da planta os parâmetros calculados são dados em moles (CO₂ ou água) por segundo.

O conteúdo de clorofila foi estimado com um clorofilômetro SPAD-502 (Konica-Minolta, Tóquio, Japão). A base, o meio e o ápice de uma folha por planta foram avaliados e, posteriormente, a média foi calculada.

2.4 Eficiência do uso de água (WUE)

Ao final do experimento, dois tipos de eficiência do uso de água (WUE) foram calculadas: (1) instantâneo (WUE_i) e a (2) acumulada (WUE_a) (KRAMER; BOYER, 1995). A WUE_i ($\mu\text{mol}_{\text{CO}_2} \text{mmol}_{\text{H}_2\text{O}}^{-1}$) foi calculada como a razão entre os valores da fotossíntese (A) e a transpiração (E) obtidos nas análises do IRGA. A WUE_a ($\text{mg}_{\text{massa seca}} \text{g}_{\text{H}_2\text{O}}^{-1}$) foi calculada como a razão entre a massa seca total (MS_t) e a água total consumida no período (MS_t / água total consumida).

2.5 Análise anatômica

Uma folha totalmente desenvolvida foi removida e fixada em etanol 70% (JOHANSEN, 1940). As seções transversais foram realizadas usando lâminas de aço nas regiões da base, meio e ápice da folha. Os cortes foram clarificados com hipoclorito de sódio a 50% e lavados duas vezes em água destilada por 10 min. Além disso, os cortes foram corados com solução de safrablau (1% de safranina e 0,1% de astra blue na proporção de 1:7) e, posteriormente, montados em lâminas com 50% de glicerol (JOHANSEN, 1940). Impressões paradérmicas das folhas (SEGATTO et al., 2004) foram retiradas das superfícies das faces abaxial e adaxial usando resina de cianoacrilato e então montadas em lâminas. As impressões paradérmicas foram retiradas no período da manhã, das 6h às 8h, quando os estômatos deveriam estar abertos. Os cortes foram fotografados em microscópio óptico CX31 (Olympus, Tóquio, Japão). Uma lâmina por folha foi montada contendo três seções e quatro campos e analisadas e os dados foram calculados para cada réplica. As imagens foram analisadas com o software ImageJ (Wayne Rasband National Institutes of Health, EUA).

As seguintes características anatômicas dos cortes transversais foram avaliadas: espessura foliar, área foliar total e a área do mesofilo. As porcentagens de células no mesofilo e nos feixes vasculares foram calculadas da seguinte forma: $A\% = (\text{TA} / \text{área foliar total}) * 100$, onde: A% é a proporção de um determinado tecido e TA é a área medida do tecido.

Para os cortes paradérmicos, foram analisadas as seguintes estruturas: área da seção, número de estômatos, número de células epidérmicas regulares, área do poro estomático, número de estômatos abertos e número de estômatos fechados. A densidade estomática (DP) foi calculada da seguinte forma: $DP = \text{número de estômatos} * (10^6 / \text{área de seção})$. O índice estomático (SI) foi calculado da seguinte forma: $SI = [\text{número de estômatos} / (\text{número de estômatos} + \text{número de células epidérmicas regulares})] * 100$. A porcentagem de estômatos abertos (OS) foi calculada da seguinte forma: $OS = (\text{número de estômatos abertos} / \text{número total de estômatos}) * 100$. A porcentagem de estômatos fechados (CS) foi calculada como: $CS = 100 - OS$. A área dos poros estomáticos por planta (SP) foi calculada da seguinte forma: $SP = \text{área dos poros estomáticos} * \text{densidade estomática} * \text{área foliar}$, todas nas mesmas unidades de área (milímetros quadrados). O número de estômatos por planta (NSP) foi calculado da seguinte forma: $NSP = \text{densidade estomática} * \text{área foliar}$, com as mesmas unidades de área (milímetros quadrados).

2.6 Análise estatística

Os dados foram submetidos à ANAVA one-way, e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott para $p < 0,05$ ou análise de regressão pelo software Sisvar 5.0 (FERREIRA, 2011). Antes da análise paramétrica, os dados foram testados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e todas as variáveis apresentaram distribuição normal.

3 RESULTADOS

Houve redução na altura das plantas de *Zea mays* L. ao longo do período experimental em condições de seca (Fig.1A). O número de folhas por planta apresentou o mesmo padrão para todos os tratamentos aumentando até o trigésimo dia e depois diminuindo (Fig. 1B). A seca causou redução significativa na área foliar (Fig. 2A), na largura (Fig. 2B) e na relação comprimento / largura (Fig. 2D); no entanto, não apresentou efeito significativo no comprimento da folha (Fig. 2C).

O déficit hídrico causou redução na massa seca da raiz, caule, folha e na massa seca total (Fig. 3A). Nenhuma modificação significativa foi encontrada na alocação de biomassa para raiz, caule e folha (Fig. 3B). A massa de água na raiz, caule e folha apresentou redução significativa em condições secas (Fig. 3C). O potencial hídrico foliar não foi modificado (Fig. 3D). O tratamento com 50% CC diminuiu a retenção de água e aumentou a perda de água por evapotranspiração (Fig. 3, E e F).

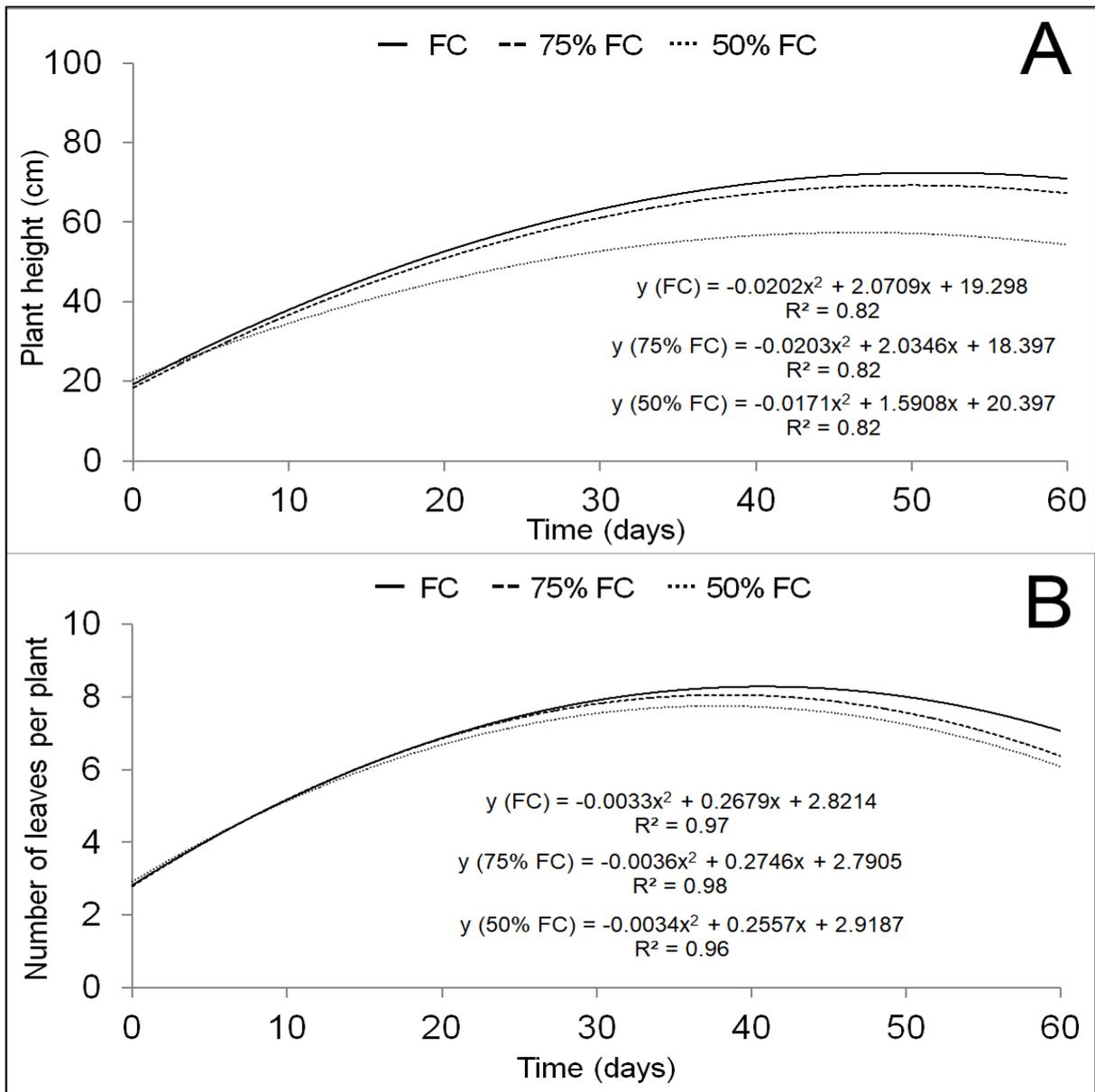
A seca não causou mudanças significativas na fotossíntese líquida (Fig. 4A), na transpiração (Fig. 4B), na condutância estomática para vapor de água (Fig. 4C) e na condutância estomática para CO₂ (dióxido de carbono) (Fig. 4D); no entanto, quando os parâmetros de trocas gasosas foram calculadas para a planta inteira, diferenças significativas entre os tratamentos foram observadas na fotossíntese da planta inteira (Fig. 5A), na transpiração (Fig. 5B) e na condutância estomática para vapor de água (Fig. 5C). A seca não causou efeito significativo no conteúdo de clorofila de *Z. mays* (Fig. 5D). *Zea mays* não mostrou mudanças na eficiência do uso da água instantânea (Fig. 4E). Apesar disso, houve diferença significativa na eficiência do uso da água acumulada em condições de seca (Fig. 4F).

A seca causou redução significativa na espessura foliar das plantas de milho (Fig. 6A e Fig. 8); no entanto, todos os tecidos e estruturas da folha não mostraram deformação pronunciada (Fig. 8). Os níveis mais baixos de água diminuíram a área do mesofilo das folhas de *Z. mays* (Fig. 6B). Além disso, não houve alteração na proporção de células e nos feixes vasculares das folhas (Fig. 6, C e D).

A seca não causou efeito na densidade estomática do milho (Fig. 7A). O índice estomático na superfície adaxial foi reduzido em condição de déficit hídrico, mas não afetou a superfície abaxial (Fig. 7B). O déficit hídrico causou redução significativa no número total de estômatos por planta na superfície abaxial e adaxial (Fig. 7C). Nenhuma modificação foi detectada para o número de estômatos abertos e fechados na superfície adaxial e abaxial da

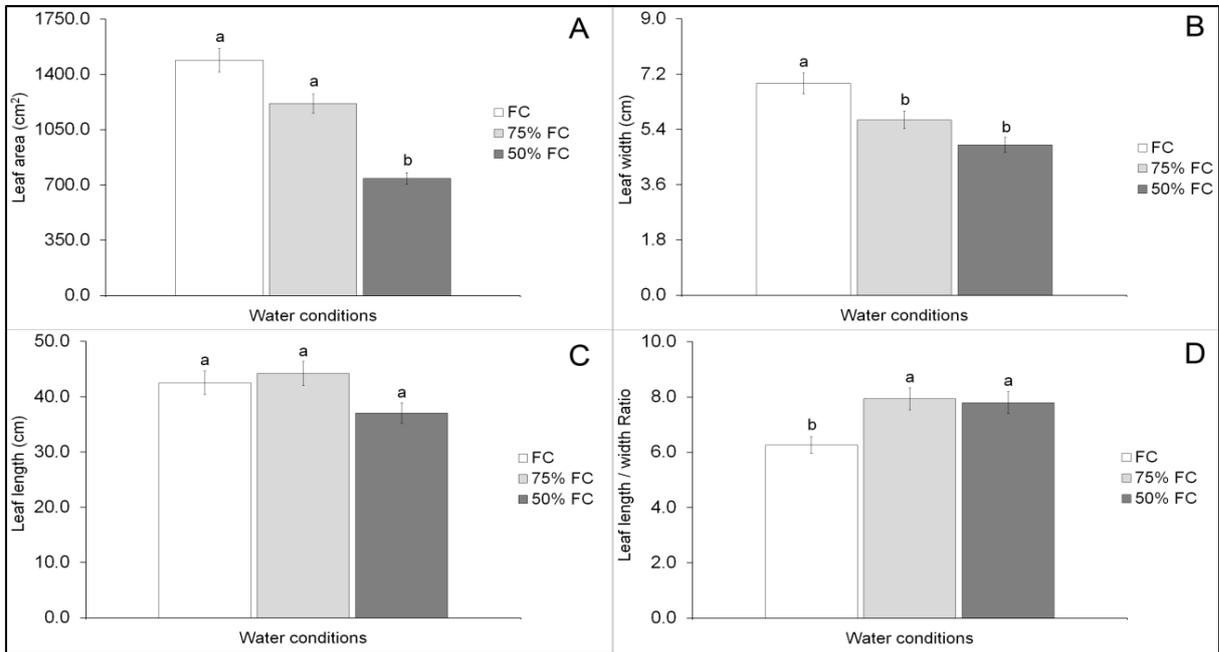
folha (Fig. 7, D e E). A área do poro estomático e a área do poro estomático por planta não foram modificadas pela seca na superfície adaxial (Fig. 7, F e G); no entanto, o tratamento com 50% da CC reduziu a área do poro estomático na superfície abaxial (Fig. 7, F e G).

Figura 1 – Altura e número de folhas em *Zea mays* sob capacidade de campo (CC), 75% da CC e 50% da CC.



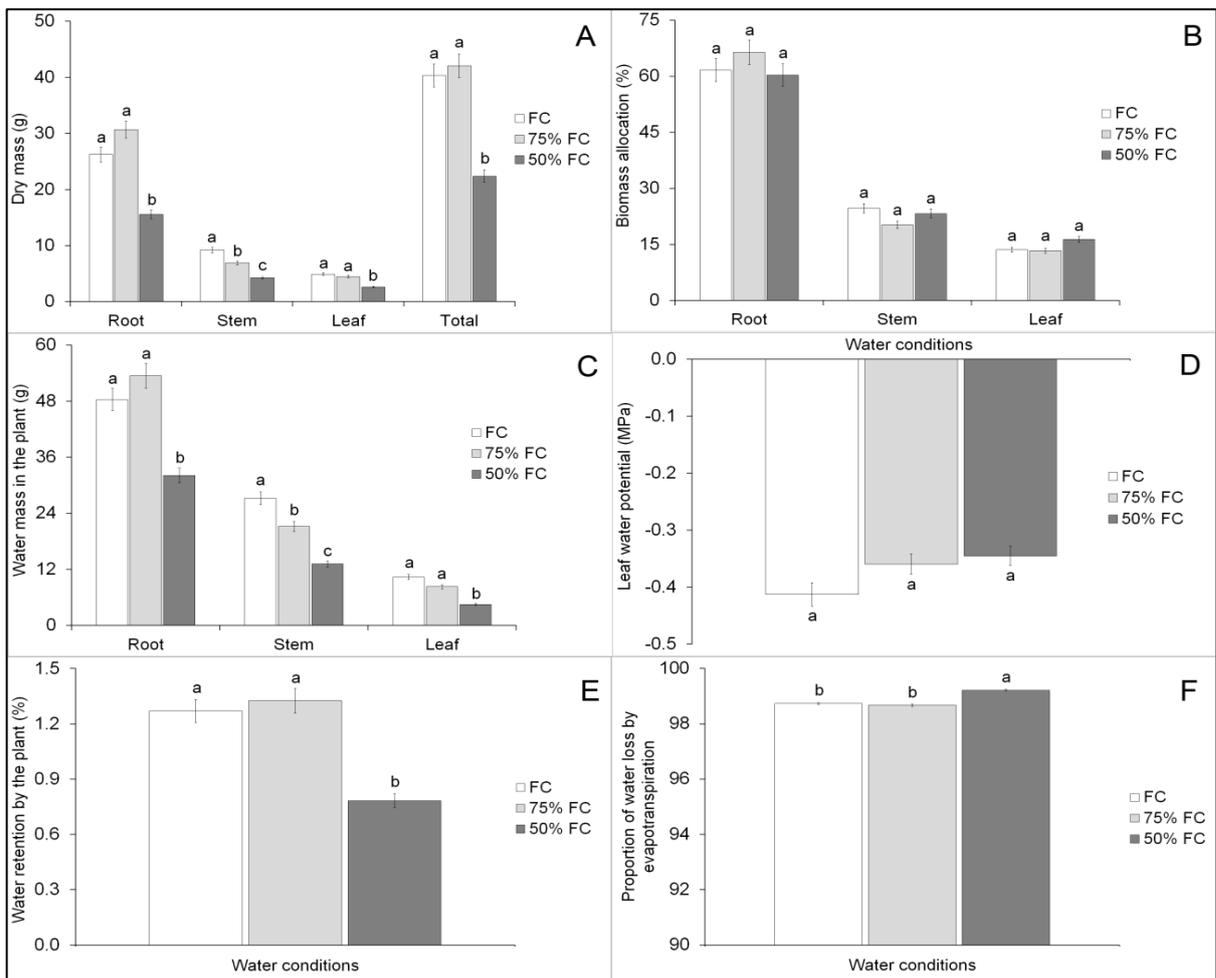
Fonte: Do autor (2021).

Figura 2 – Morfometria foliar em *Zea mays* sob capacidade de campo (CC), 75% da CC e 50% da CC.



Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott em $P < 0,05$. Barras = erro padrão.
Fonte: Do autor (2021).

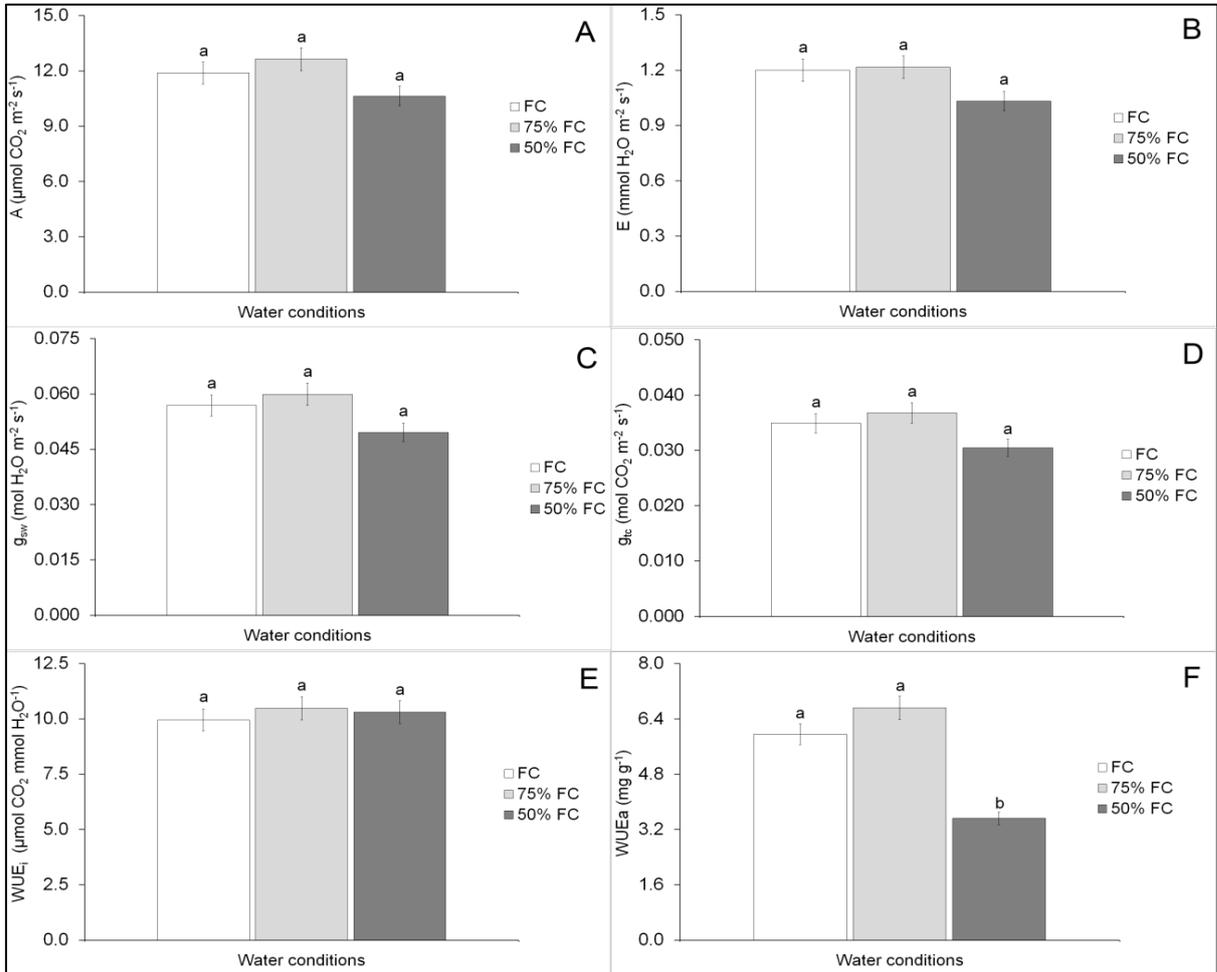
Figura 3 – Parâmetros de crescimento e relações hídricas em *Zea mays* sob capacidade de campo (CC), 75% da CC e 50% da CC.



Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott em $P < 0,05$. Barras = erro padrão.

Fonte: Do autor (2021).

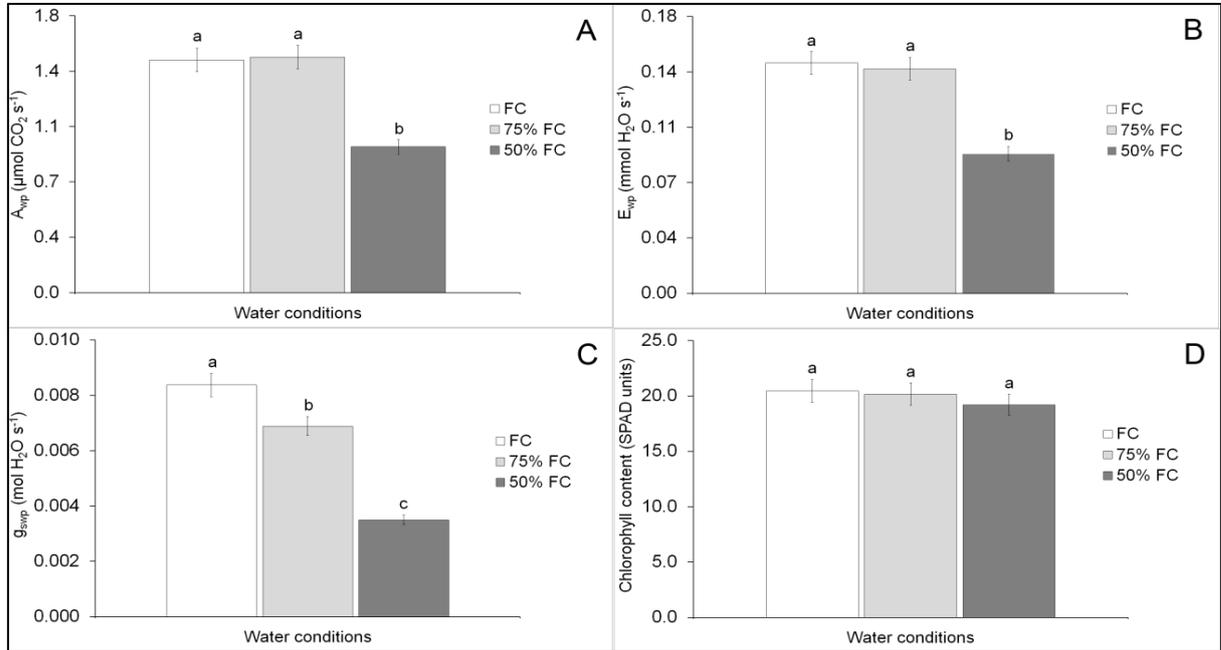
Figura 4 – Trocas gasosas em folhas de *Zea mays* sob capacidade de campo (CC), 75% da CC e 50% da CC. (A) = Taxa fotossintética líquida; (E) = Transpiração; (g_{sw}) = Condutância estomática para o vapor de água; (g_{tc}) = Condutância total de CO_2 na folha; (WUE_i) = Eficiência no uso da água instantânea; (WUE_a) = Eficiência no uso da água acumulada.



Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott em $P < 0,05$. Barras = erro padrão.

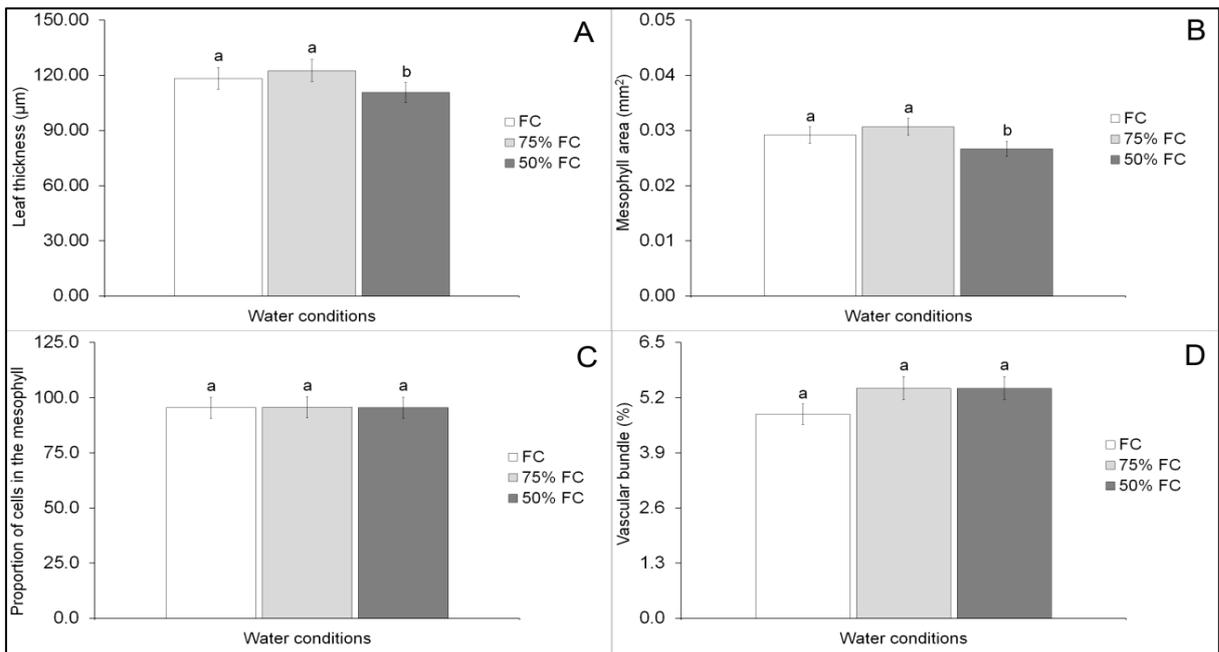
Fonte: Do autor (2021).

Figura 5 – Trocas gasosas e conteúdo de clorofila em *Zea mays* sob capacidade de campo (CC), 75% da CC e 50% da CC. (A_{wp}) = Fotossíntese da planta inteira; (E_{wp}) = Transpiração da planta inteira; (g_{swp}) = Condutância estomática para o vapor de água da planta inteira.



Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott em $P < 0,05$. Barras = erro padrão.
Fonte: Do autor (2021).

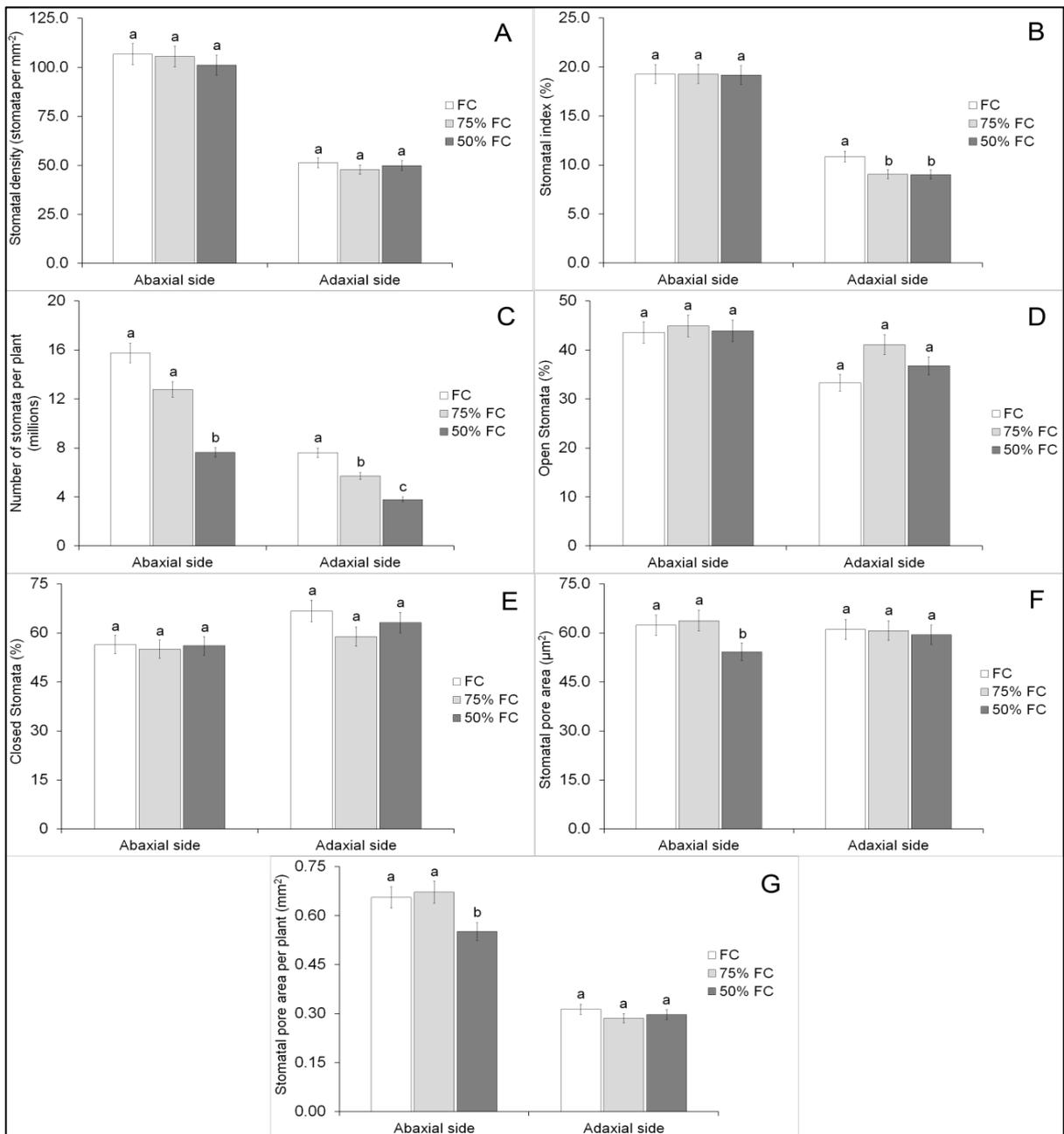
Figura 6 – Características dos tecidos foliares de *Zea mays* sob capacidade de campo (CC), 75% da CC e 50% da CC.



Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott em $P < 0,05$. Barras = erro padrão.

Fonte: Do autor (2021).

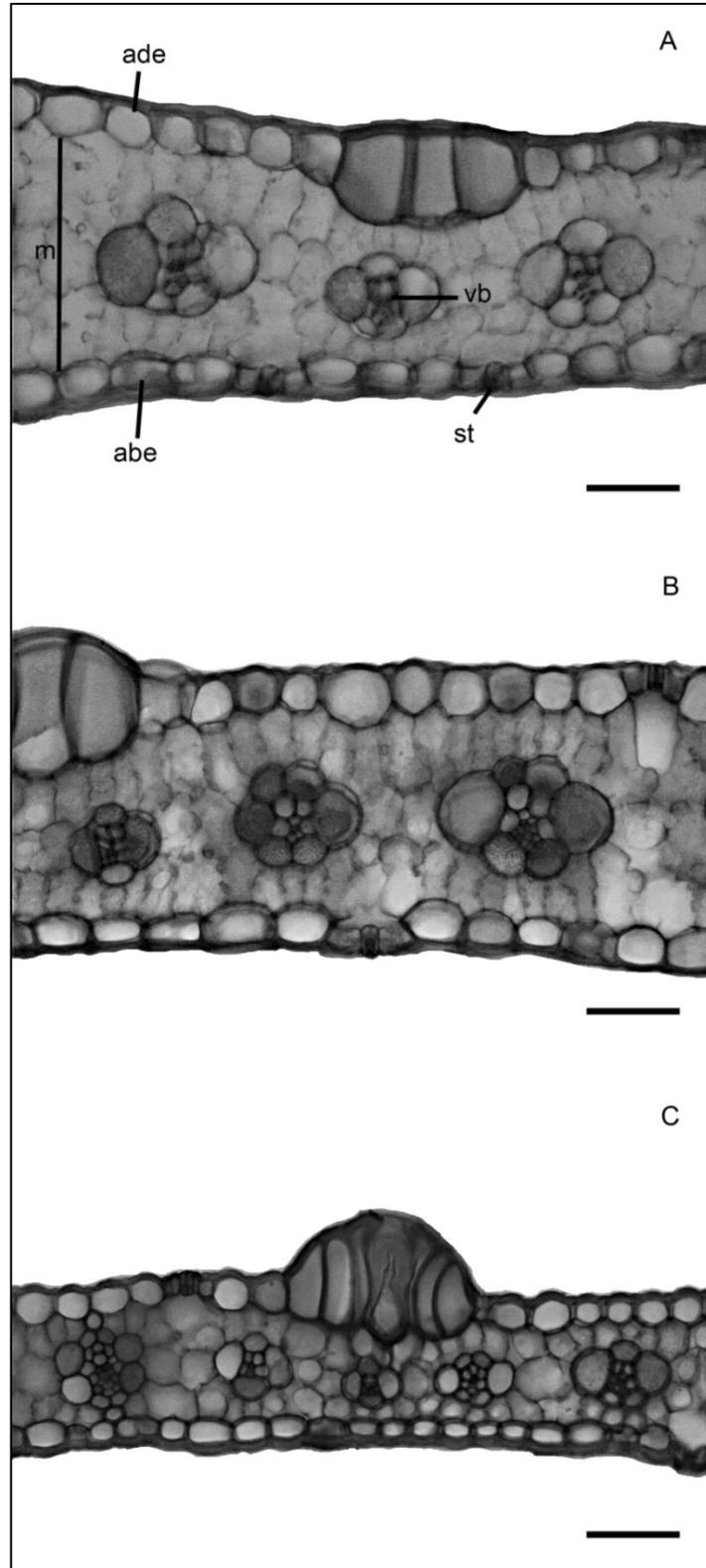
Figura 7. Características anômicas da folha em seções paradérmicas de *Zea mays* sob capacidade de campo (CC), 75% da CC e 50% da CC.



Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si de acordo com o teste de Scott-Knott em $P < 0,05$. Barras = erro padrão.

Fonte: Do autor (2021).

Figura 8 - Seções transversais das folhas de *Zea mays* sob diferentes condições de água. A = Capacidade de campo (CC); B = 75% da CC; C = 50% da CC. ade = epiderme adaxial, abe = epiderme abaxial, m = mesofilo, vb = feixe vascular, st = estômato. Barras = 50 μ m.



Fonte: Do autor (2021).

4 DISCUSSÃO

As plantas de milho sobreviveram em condições de seca e, portanto, não houve taxa de mortalidade. De fato, o déficit hídrico pode levar a morte prematura de plantas (CRUZ et al., 2019). Apesar disso, os resultados obtidos com este trabalho demonstram que a redução da disponibilidade hídrica afetou diretamente as características fisiológicas e estruturais das plantas de milho. A seca reduziu o crescimento das plantas de milho ao longo do período experimental. Resultados semelhantes foram encontrados em Song et al. (2018) e Zhou et al. (2020). O déficit hídrico reduziu o número de folhas, a partir do quadragésimo dia. A redução do número de folhas é considerada uma resposta comum diante da seca, uma vez que a limitação hídrica causa baixa pressão de turgor celular que aumenta a ocorrência de senescência e abscisão foliar (RUCKER et al., 1995; WIDURI et al., 2020). Além disso, a baixa pressão de turgor também causa diminuição da expansão foliar influenciando as trocas gasosas (ANYIA; HERZOG, 2004; WYKA et al., 2019). Portanto, a expansão foliar e a queda precoce das folhas estão diretamente relacionadas com a área foliar. A sua redução pode ocasionar diminuição da biomassa e do crescimento das plantas por causa da limitação nas trocas gasosas e este mecanismo pode ser considerado uma estratégia para evitar a seca.

O déficit hídrico reduziu significativamente a área foliar. Isso causou uma menor área fotossintética e transpiratória diminuindo estes parâmetros na planta inteira, o que limitou o crescimento das plantas de milho. De fato, a área foliar é mais sensível ao déficit hídrico (LEUSCHNER, 2020). A diminuição de sua área é considerada uma das respostas mais comuns ao déficit hídrico permitindo que as plantas reduzam sua transpiração e a perda de água (CLAUW et al., 2015; HSIE et al., 2015). Portanto, a limitação de água causou modificações na área foliar refletindo nas trocas gasosas. Isso pode auxiliar no controle da perda de água, mas reduz o ganho de biomassa afetando o crescimento da planta.

Outro aspecto importante é a relação direta entre a redução da área foliar com a diminuição da largura das folhas, pois não houve modificação no comprimento foliar em condições seca. Isso ocasionou aumento na razão do comprimento pela largura foliar. De fato, a resposta mais comum diante da seca é reduzir o comprimento e a largura das folhas (WYKA et al., 2019). Além disso, é uma característica comum das folhas do milho apresentarem maiores comprimentos. Isso permite realizar o processo fotossintético de maneira desigual ao longo da folha e concentrando maiores taxas na região mediana sendo este dependente da largura. Dessa forma, a redução da área foliar no milho é atribuída pela diminuição da largura e não apenas pela diminuição do número de folhas. A redução da área foliar possui relação

entre a inibição da expansão foliar e a abscisão das folhas em condições de seca (ANYIA; HERZOG, 2004; ZHOU et al., 2020). Portanto, o milho demonstrou plasticidade foliar reduzindo a largura sem afetar o comprimento das folhas.

As alterações nas dimensões foliares podem estar relacionadas com as atividades meristemáticas, pois possuem relação direta com a redução da largura e espessura foliar influenciando na morfologia das folhas em condições de seca. O déficit hídrico pode causar a interrupção do fornecimento de água nas células meristemáticas diminuindo severamente a expansão celular e, inclusive, afetando o processo de divisão celular reduzindo a multiplicação das células (NONAMI, 1998; TRAAS; BOHN-COURSEAU, 2005). Portanto, nota-se que alterações na morfologia foliar estão relacionadas com as atividades meristemáticas. Estas modificações nas plantas de milho causaram redução da área foliar, o que influenciou na assimilação de CO₂ e no crescimento diante da seca.

A discussão acima relaciona a redução do crescimento com a área foliar. A massa seca reduziu em condições de seca. Isso demonstra que houve uma diminuição deste parâmetro para cada órgão vegetativo afetando diretamente a massa seca total das plantas. A redução na massa seca da raiz, caule, folha estão positivamente correlacionadas com o déficit hídrico (CAI et al., 2020). Isso afeta a produtividade das plantas e o crescimento, pois a massa seca é considerada a base de formação dos órgãos vegetativos (DJAMAN et al., 2013; ZHOU et al., 2020). Apesar disso, não houve modificações na alocação de biomassa da raiz, caule e folha. Isso demonstra ausência de deformação nos órgãos vegetativos e, portanto, houve manutenção da raiz, caule e folha em toda planta; no entanto, a falta de investimento em biomassa prejudicou o crescimento do milho. A resposta comum de plantas tolerantes à seca é o investimento em biomassa nas raízes, pois aumenta a probabilidade de obtenção de água facilitando o crescimento da planta (GLEASON et al., 2019; SOUZA et al., 2016; ZHAO et al., 2018). Além disso, o investimento em sistema radicular tem sido considerado como um dos mecanismos envolvidos na adaptação das plantas ao estresse hídrico (TURNER, 1996). Apesar de não ocorrer deformação nos órgãos vegetativos a falta de investimento em biomassa limitou o crescimento das plantas em condições de seca, pois o milho não conseguiu adquirir biomassa para investir em cada órgão vegetativo, principalmente na raiz. Isso possui relação com a taxa fotossintética e com a área foliar que diminuíram em condições de seca.

O déficit hídrico causou redução na massa de água da raiz, do caule e da folha. Isso pode estar relacionado com a ausência de investimento nas raízes que influenciou na menor obtenção de água do substrato para a planta, uma vez que maior número de raízes eleva a captação de água auxiliando no crescimento vegetal (GLEASON et al., 2019; SOUZA et al.,

2016; ZHAO et al., 2018). Neste contexto, menor quantidade de água causou limitações no processo de abertura e fechamento estomático afetando a transpiração, a condutância estomática e a fotossíntese. A seca causa modificações na morfologia estomática e seus movimentos (abertura e fechamento) o que afeta a troca de vapor de água, dióxido de carbono e a condutância estomática entre as folhas e a atmosfera (GERARDIN et al., 2018; TORRE et al., 2021). Além disso, houve menor retenção de água nas plantas o que aumentou a evapotranspiração em condições de seca. Isso tem relação com a diminuição da taxa transpiratória; no entanto, a grande parte da água economizada permaneceu no substrato. A água que estava no substrato evaporou aumentando a evapotranspiração. De fato, o aumento da evapotranspiração possui relação com a evaporação do solo (GORTHI; VOLENEC; WELP, 2019). Portanto, a seca dificulta severamente a retenção e o fluxo de água do substrato para a planta e a grande parte da água acaba sendo perdida pela evaporação elevando a evapotranspiração. Este comportamento pode estar relacionado com a falta de investimento em raízes. Isso tem relação com a diminuição da área foliar, o que afetou o ganho de biomassa na planta.

Ocorreu a manutenção do potencial hídrico nas plantas de milho em condições de seca; no entanto, houve redução da massa de água. Isso indica que a absorção de água nas plantas foi mantida. De fato, o potencial hídrico está relacionado com a disponibilidade de água do solo e a captação de água pela planta (OGBAGA et al., 2020). Portanto, este parâmetro demonstra que a redução da massa de água possui relação direta com a falta de investimento em raízes, pois o fluxo de água foi mantido.

Outro aspecto interessante é que o potencial hídrico possui relação com a tensão de água no xilema e, portanto, houve ajustes nos vasos xilemáticos nas plantas, o que manteve a pressão parcial de água e a condutividade hidráulica em condições de seca evitando a formação de embolia nos vasos permitindo o transporte de água do solo para as folhas. Isso é corroborado por Gleason et al. (2019). Além disso, permitiu a manutenção do tecido vascular e evitou alterações nos vasos contribuindo na estabilização da tensão e no transporte de água no xilema para o processo de transpiração. De fato, o suprimento de água através do xilema é essencial, pois as folhas precisam reabastecer constantemente a água perdida pela transpiração (CARMINATI; JAVAUX, 2020; SCOFFONI et al., 2017). A manutenção do transporte de água permitiu que o processo de abertura e fechamento estomático não sofresse alterações, uma vez que a condutividade hidráulica do solo é o principal desencadeador do fechamento estomático (CARMINATI; JAVAUX, 2020). Portanto, a manutenção do potencial hídrico permitiu a estabilidade no transporte de água. Isso manteve o processo de transpiração nas

folhas; no entanto, nota-se que a transpiração na planta diminuiu podendo estar relacionada com a redução da área foliar, uma vez que o transporte de água foi mantido na planta.

As variáveis de trocas gasosas mantiveram-se inalteradas em condições de seca e, portanto, as plantas de milho mantêm as trocas gasosas por unidade de área de folha. Apesar disso, houve reduções significativas na fotossíntese, na transpiração e na condutância estomática para toda a planta. Neste contexto, nota-se que a análise pontual é realizada diretamente na câmara do analisador de gases por infravermelho que possui área de 6cm^2 ; e estes parâmetros para toda a planta são calculados para 1m^2 . Quando a fotossíntese, a transpiração e a condutância estomática são calculadas para a área foliar real da planta, os resultados são mais razoáveis, porque os meios estão mais próximos da capacidade fotossintética real das plantas. Portanto, a seca reduziu os parâmetros de trocas gasosas do milho na planta toda. Isso possui relação com a redução da área foliar que influenciou na assimilação de CO_2 e no ganho de biomassa reduzindo o crescimento das plantas.

Outra consequência dos dados obtidos diretamente na avaliação pontual com o analisador de gases infravermelho foi à manutenção da eficiência do uso instantâneo da água em condições de seca. Isso tem relação com a transpiração e a fotossíntese que permaneceram sem alterações no milho. Isso não é verdade para as plantas, uma vez que os resultados para preservação de água mostraram que o milho não conseguiu evitar a perda de água em condições de seca (Figura 03). Neste contexto, as plantas não possuem uma otimização no uso da água o que corrobora com o resultado da eficiência uso da água acumulada. De fato, este parâmetro está diretamente relacionado à produção real de biomassa pelas plantas e com a água consumida para o crescimento. Portanto, a eficiência do uso da água acumulada apresentou resultados mais condizentes e também apoia a redução da área foliar em condições de seca.

O déficit hídrico reduziu a espessura foliar e a área do mesofilo, mas não afetou a proporção de células e o conteúdo de clorofila. Isso é considerado uma resposta comum de plantas ao déficit hídrico (FENG et al., 2013; LIU et al., 2019). A redução destes afetou toda morfologia foliar da planta diminuindo a largura e a área foliar; no entanto, manteve o comprimento das folhas. Além disso, a proporção de células do mesofilo permitiu a manutenção do comprimento foliar em condições de seca. Isso é importante, pois demonstrou uma plasticidade foliar do milho. De fato, reduzir a área foliar pode ser considerado uma estratégia das plantas para evitar os efeitos da restrição hídrica (ANYIA; HERZOG, 2004). Portanto, reduções na espessura foliar e na área do mesofilo influenciaram na área foliar. Isso pode ser considerada como estratégia para evitar a seca. Apesar disso, reduzindo a área foliar

causou a diminuição das trocas gasosas, o que afetou o crescimento das plantas em condições de seca.

Ocorreram ainda algumas modificações nas características estomáticas em função da seca. A densidade estomática não apresentou modificação significativa nas superfícies adaxial e abaxial. O índice estomático reduziu em condições de seca na face adaxial da folha, mas sem alteração na face abaxial da folha. Segundo Gerardin et al. (2018) as plantas são conhecidas por ajustar a densidade e o índice estomático sendo uma estratégia comum para evitar as condições de seca. Apesar disso, mais informações são necessárias para entender os ajustes estomáticos pelo milho na seca, uma vez que as plantas sob seca podem diminuir a densidade estomática (MANSOOR et al., 2019) ou aumentá-la (HSIE et al., 2015). Isso também ocorre para o índice estomático que pode aumentar (TORRE et al., 2021) ou diminuir (SILVA et al., 2009). Neste contexto, existe uma contradição na literatura sobre estes parâmetros e, portanto, o cálculo do número total de estômatos por planta foi extremamente importante.

O número total de estômatos apresentou uma redução significativa em ambas às superfícies da folha. A diminuição do número de estômatos é uma resposta comum diante da seca, uma vez que diminuindo a quantidade de estômatos reduz a transpiração e a perda de água (GERARDIN et al., 2018; WANG; CHEN; XIANG, 2007) e causa uma redução na taxa fotossintética. Isso afeta o ganho de biomassa e o crescimento da planta. As plantas mantêm as trocas gasosas através dos estômatos e sua redução pode apresentar uma restrição ao fluxo de CO₂ (CAI et al., 2020). Portanto, a redução do número total de estômatos prejudicou diretamente as trocas gasosas. Isso está relacionada com a diminuição da área foliar em condições de seca.

A discussão acima mostra a importância do cálculo do número total de estômatos por planta e, inclusive, este parâmetro corroborou com a redução da largura e a área foliar. Isso influenciou na fotossíntese, na transpiração e na condutância estomática de toda planta. Além disso, demonstrou que são necessários outros cálculos, além da densidade e o índice estomático que são comumente usados. Vale ressaltar que menor quantidade de estômatos também influenciou na abertura e no fechamento dos estômatos causando menor controle estomático das trocas gasosas no milho. De fato, o déficit hídrico nas plantas causa fechamento dos estômatos (LIU et al., 2019). Isso reduz as trocas gasosas e pode ser considerado como um mecanismo adaptativo (de escape) para reduzir a perda de água. Isso é corroborado por Zia et al. (2021).

O déficit hídrico causou redução significativa do poro estomático na superfície abaxial, mas não houve alteração na superfície adaxial da folha. Isso indica que a face abaxial apresentou menor quantidade de estômatos e com o tamanho do poro reduzido, o que afetou na diminuição das trocas gasosas. De fato, os ajustes dinâmicos na abertura dos poros estomáticos são responsáveis pela regulação da condutância estomática permitindo que as plantas reduzam rapidamente a transpiração e a perda de água em condições de seca (HASANAGIĆ et al., 2020; WANG; CHEN; XIANG, 2007). Portanto, a redução do poro deixou os estômatos menores e associado com a redução do número de estômatos afetou diretamente as trocas gasosas e estas mudanças estão diretamente relacionadas com a diminuição da área foliar.

As plantas de milho sobreviveram em condições de seca. Apesar disso, o crescimento e o número de folhas foram afetados ao longo do experimento. Isso está relacionado com a diminuição da fotossíntese, menor número de estômatos foliares e com o poro reduzido na face abaxial. Estes afetaram a taxa de assimilação de CO₂ e o ganho de biomassa para os órgãos vegetativos. Portanto, a diminuição dos parâmetros citados está diretamente ligada com a redução significativa da área foliar causado pela restrição hídrica.

5 CONCLUSÃO

A seca causou alterações significativas em plantas de *Zea mays* L. Isso foi evidente pela redução no crescimento e no número de folhas. Além disso, a área foliar evidência a sensibilidade dessas plantas, pois sua redução influenciou nas trocas gasosas, no ganho de massa seca e no número total de estômatos. O trabalho também destaca a relevância do cálculo do número total de estômatos para uma interpretação mais condizente dos dados. Portanto, a área foliar nas plantas de milho possui relação com as respostas morfofisiológicas em condições de seca e pode ser considerado como um mecanismo para sobreviver nestas condições.

REFERÊNCIAS

- ANYIA, A. O.; HERZOG, H. Water-use efficiency, leaf area and leaf gas exchange of cowpeas under mid-season drought. **European Journal of Agronomy**, France, v. 20, n. 4, p. 327-339, 2004.
- AVRAMOVA, V. *et al.* Drought induces distinct growth response, protection, and recovery mechanisms in the maize leaf growth zone. **Plant physiology**, Londrina, v. 169, n. 2, p. 1382-1396, 2015.
- CAI, F. *et al.* Maize (*Zea mays* L.) physiological responses to drought and rewatering, and the associations with water stress degree. **Agricultural Water Management**, Netherlands, v. 241, p. 106379, 2020.
- CARMINATI, A.; JAVAUX, M. Soil rather than xylem vulnerability controls stomatal response to drought. **Trends in plant science**, v. 25, n. 9, p. 868-880, 2020.
- CLAUW, P. *et al.* Leaf responses to mild drought stress in natural variants of Arabidopsis. **Plant physiology**, Londrina, v. 167, n. 3, p. 800-816, 2015.
- COWAN, M. F. *et al.* Crop wild relatives as a genetic resource for generating low-cyanide, drought-tolerant Sorghum. **Environmental and Experimental Botany**, England, v. 169, p. 103884, 2020.
- CRUZ, Y. C. *et al.* Growth of *Typha domingensis* as related to leaf physiological and anatomical modifications under drought conditions. **Acta Physiologiae Plantarum**, Kraków, v. 41, n. 5, p. 64, 2019.
- DÍAZ, A. S. *et al.* Aerenchyma development in different root zones of maize genotypes under water limitation and different phosphorus nutrition. **Biologia plantarum**, Praga, v. 62, n. 3, p. 561-568, 2018.
- DJAMAN, K. *et al.* Maize evapotranspiration, yield production functions, biomass, grain yield, harvest index, and yield response factors under full and limited irrigation. **Transactions of the ASABE**, United States, v. 56, n. 2, p. 373-393, 2013.
- FENG, R. *et al.* Analysis of the relationship between the spectral characteristics of maize canopy and leaf area index under drought stress. **Acta Ecologica Sinica**, Netherlands, v. 33, n. 6, p. 301-307, 2013.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- GERARDIN, T. *et al.* Shade and drought growth conditions strongly impact dynamic responses of stomata to variations in irradiance in *Nicotiana tabacum*. **Environmental and Experimental Botany**, England, v. 153, p. 188-197, 2018.
- GLEASON, S. M. *et al.* Stomatal conductance, xylem water transport, and root traits underpin improved performance under drought and well-watered conditions across a diverse panel of maize inbred lines. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 234, p. 119-128, 2019.

GORTHI, A.; VOLENEC, J. J.; WELP, L. R. Stomatal response in soybean during drought improves leaf-scale and field-scale water use efficiencies. **Agricultural and Forest Meteorology**, Amsterdam, v. 276, p. 107629, 2019.

HASANAGIĆ, D. *et al.* Long term drought effects on tomato leaves: anatomical, gas exchange and antioxidant modifications. **Acta Physiologiae Plantarum**, Kraków, v. 42, n. 7, p. 1-14, 2020.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D.I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Davis: California agricultural experiment station, 1950.

HSIE, B. S. *et al.* *Jatropha curcas* L.(Euphorbiaceae) modulates stomatal traits in response to leaf-to-air vapor pressure deficit. **Biomass and Bioenergy**, Estados Unidos, v. 81, p. 273-281, 2015.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. 1nd ed. London: Mcgraw-Hill Book Company, Inc. 523 p, 1940.

KRAMER, P. J.; BOYER, J. S. **Water relations of plants and soils**. Academic press (San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo e Toronto), 1995.

LEUSCHNER, C. Drought response of European beech (*Fagus sylvatica* L.)—A review. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, Germany, v. 47, p. 125576, 2020.

LIU, B. *et al.* Drought stress affects on growth, water use efficiency, gas exchange and chlorophyll fluorescence of *Juglans* rootstocks. **Scientia horticulturae**, Amsterdam, v. 250, p. 230-235, 2019.

MANSOOR, U. *et al.* Structural modifications for drought tolerance in stem and leaves of *Cenchrus ciliaris* L. ecotypes from the Cholistan Desert. **Flora**, Germany, v. 261, p. 151485, 2019.

NONAMI, H. Plant water relations and control of cell elongation at low water potentials. **Journal of Plant Research**, Japan, v. 111, n. 3, p. 373-382, 1998.

OGBAGA, C. C. *et al.* Clarity on frequently asked questions about drought measurements in plant physiology. **Scientific African**, Netherlands, v. 8, p. e00405, 2020.

RUCKER, K. S. *et al.* Identification of peanut genotypes with improved drought avoidance traits. **Peanut science**, United States, v. 22, n. 1, p. 14-18, 1995.

SANTOS, K. R. *et al.* *Typha domingensis* Pers. Growth responses to leaf anatomy and photosynthesis as influenced by phosphorus. **Aquatic Botany**, Amsterdam, v. 122, p. 47-53, 2015.

SAPETA, H. *et al.* Drought stress response in *Jatropha curcas*: growth and physiology. **Environmental and Experimental Botany**, England, v. 85, p. 76-84, 2013.

SCHOLANDER, P. F. *et al.* Sap pressure in vascular plants: negative hydrostatic pressure can be measured in plants. **Science**, Estados Unidos, v. 148, n. 3668, p. 339-346, 1965.

SCOFFONI, C. *et al.* Testing for ion-mediated enhancement of the hydraulic conductance of the leaf xylem in diverse angiosperms. **Journal of Plant Hydraulics**, France, v. 4, p. e-004, 2017.

SEGATTO, F. B. *et al.* A technique for the anatomical study of potato leaf epidermis. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 5, p. 1597-1601, 2004.

SILVA, E. C. *et al.* Stomatal changes induced by intermittent drought in four umbu tree genotypes. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Brazil, v. 21, n. 1, p. 33-42, 2009.

SONG, H. *et al.* Maize leaf functional responses to drought episode and rewatering. **Agricultural and Forest Meteorology**, Amsterdam, v. 249, p. 57-70, 2018.

SOUZA, T. C. D. *et al.* Corn root morphoanatomy at different development stages and yield under water stress. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 51, n. 4, p. 330-339, 2016.

TRAAS, J.; BOHN-COURSEAU, I. Cell proliferation patterns at the shoot apical meristem. **Current opinion in plant biology**, Oxford, v. 8, n. 6, p. 587-592, 2005.

TORRE, F. *et al.* Leaf morphophysiological changes induced by long-term drought in *Jatropha curcas* plants explain the resilience to extreme drought. **Journal of Arid Environments**, United Kingdom, v. 185, p. 104381, 2021.

TURNER, N. C. Further progress in crop water relations. **Advances in agronomy**, Netherlands, v. 58, p. 293-338, 1996.

WANG, Y.; CHEN, X.; XIANG, C.-B. Stomatal density and bio-water saving. **Journal of Integrative Plant Biology**, United Kingdom, v. 49, n. 10, p. 1435-1444, 2007.

WIDURI, L. I. *et al.* Short-term drought exposure decelerated growth and photosynthetic activities in chili pepper (*Capsicum annuum* L.). **Annals of Agricultural Sciences**, Egypt, v. 65, n. 2, p. 149-158, 2020.

WYKA, T. P. *et al.* Drought-induced anatomical modifications of barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves: An allometric perspective. **Environmental and Experimental Botany**, England, v. 166, p. 103798, 2019.

ZHAO, J. *et al.* Shoot and root traits in drought tolerant maize (*Zea mays* L.) hybrids. **Journal of Integrative Agriculture**, China, v. 17, p. 1093-1105, 2018.

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

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