

INSTITUTO POLITÉCNICO DE SANTARÉM

Escola Superior Agrária de Santarém



**POLITÉCNICO
DE SANTARÉM**

**Uso de fenotipagem digital na avaliação do efeito de bioestimulantes
na tolerância da cultura do milho ao défice hídrico.**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em:

Engenharia Agronómica

Cristiana Alves Carvalho

Santarém

2023

INSTITUTO POLITÉCNICO DE SANTARÉM

Escola Superior Agrária de Santarém



**Uso de fenotipagem digital na avaliação do efeito de bioestimulantes
na tolerância da cultura do milho ao défice hídrico.**

Trabalho realizado com vista á obtenção do
Grau de Mestre em Engenharia Agronómica

Nome. Cristiana Alves Carvalho

Nº: 1803001668

Orientador interno: Doutor Manuel Adaixo (Escola Superior Agrária de Santarém)

Orientadores externos: Doutor Luís Carvalho e Doutora Patrícia Correia (Asfertglobal,
lda.)

Santarém

2023

*“O aspecto mais estimulante da ciência
não é a busca pelas respostas definitivas,
mas a busca incessante por melhores
perguntas.”*

Isaac Asimov

Agradecimentos

Começo por agradecer à Escola Superior Agrária de Santarém do Instituto Politécnico de Santarém e a todos os docentes do Mestrado em Engenharia Agronómica por todos os conhecimentos ministrados ao longo do curso das diferentes unidades curriculares.

Ao meu orientador Professor Doutor Manuel Adaixo, agradeço pela sua disponibilidade em todas as fases deste ensaio e pela partilha de conhecimentos durante todo o meu percurso académico.

À Professora Doutora Ana Mafalda Ferreira, por ter permitido realizar as análises do solo e do material vegetal no laboratório da ESAS.

À empresa Asfertglobal por me ter permitido estagiar, por fornecer as condições necessárias para realizar o ensaio na estação experimental “Kiplant Lighthouse” e por depositar toda a confiança no uso do equipamento de fenotipagem digital. Agradeço ainda, a todos os membros das equipas de trabalho que me acolheram tão bem na empresa. Em especial, ao Rodrigo Ferreira e à Paula Garcia pela ajuda imprescindível nas fases de encher os vasos com terra, no transporte dos mesmos, e na manutenção ao longo do tempo.

Agradeço à Professora Doutora Cristina Cruz (FCUL) por me ter emprestado o aparelho *Handy PEA*, permitindo obter dados finais relativamente à fluorescência da clorofila *a*, presente nas folhas das plantas de milho.

Deixo um agradecimento muito especial à orientadora Doutora Patrícia Correia e ao orientador Doutor Luís Carvalho por toda a ajuda prestada ao longo de todo o ensaio, desde a sua estrutura, ao seu desenvolvimento e à conclusão de todo o trabalho, bem como, por estarem sempre disponíveis para esclarecer todas as minhas dúvidas, conseguindo sempre colocar um sorriso no meu rosto, não deixando o stress e as preocupações tornarem-se o foco central. Tive o prazer de acompanhá-los diariamente e, como tal, evolui profissionalmente muito graças a eles. Ficarei eternamente grata por isso.

Agradeço ainda à Mestre Ana Soares por me ter acolhido tão bem na equipa, pela sua paciência comigo ao transmitir-me os seus ensinamentos e pelo seu envolvimento no trabalho através da disponibilização dos inóculos que foram testados em ensaio.

Agradeço à minha família pela educação que me deram e toda a força que foi depositada e, ao Emanuel pela sua ajuda, o seu apoio incondicional e por toda a paciência que teve comigo sem nunca me deixar desistir.

Deixo aqui, a minha profunda gratidão por todo o apoio que me foi dado ao longo deste percurso académico.

Lista de Abreviaturas

- ABA – Ácido abscísico
- CC – Capacidade de Campo
- CRH – Com Restrição Hídrica
- DAS – Dias Após a Sementeira
- DPV – Défice de pressão vapor da atmosfera
- ESAS – Escola Superior Agrária de Santarém
- EUA – Eficiência do uso da água
- GLI – *Green Leaf Index*
- IV – Região Infravermelho
- NDVI – Índice de vegetação por diferença normalizada
- NIR – *Near Infrared*
- NPCI - *Normalized Pigments Chlorophyll Index*
- Ø – Controlo
- PGPR – *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*
- PRI – Índice de refletância fotoquímica
- SIPI – *Structure-independent pigment index*
- SRH – Sem Restrição Hídrica
- Ufc – Unidades formadoras de colónias
- VIS – Zona do visível
- Ψ_f – Potencial hídrico foliar
- Ψ_g – Efeito da gravidade no movimento da água
- Ψ_p – Pressão hidrostática ou de turgescência
- Ψ_s – Potencial osmótico
- Ψ_w – Potencial hídrico

Resumo

Atualmente, as alterações climáticas têm vindo a representar uma escassez dos recursos hídricos e um crescente aumento das temperaturas. Associado a este cenário de seca prolongada e tendo em consideração que a cultura do milho apresenta uma considerável necessidade hídrica e um grande interesse económico, torna-se importante realizar estudos relacionados com o défice hídrico de forma a evitar que a sua produtividade seja afetada.

Como tal, o presente estudo teve como objetivo principal avaliar o efeito do uso de bioestimulantes microbianos no aumento da tolerância ao stress hídrico induzido por défice hídrico, na cultura do milho, através da monitorização por fenotipagem digital de alto rendimento.

Na primeira fase do estudo, foram avaliadas dez estirpes de bactérias com efeito bioestimulante, perante duas modalidades hídricas: sem restrições hídricas (SRH) e com restrições hídricas (CRH). Procedeu-se à seleção de três bioestimulantes que mostraram uma maior indução de tolerância ao défice hídrico, através da medição da biomassa final das plantas. Como tal, observou-se que os tratamentos Bio 2, Bio 5 e Bio 10, na modalidade SRH comprovaram o seu efeito bioestimulante comparativamente ao Controlo; na modalidade CRH, induziram os maiores aumentos de biomassa de 24%, 41% e 21%, respetivamente, comparando com as plantas Controlo. Como tal, selecionaram-se estes tratamentos para a fase seguinte.

Na fase posterior, realizou-se um estudo comparativo entre as três estirpes de bactérias selecionadas, utilizando-se as mesmas modalidades hídricas. O acompanhamento do estudo através da fenotipagem digital de alto rendimento e as medidas finais efetuadas, permitiram obter resultados que demonstraram que a redução de água influenciou negativamente o desenvolvimento das plantas do Controlo na modalidade CRH, em comparação com as plantas do Controlo na modalidade SRH. Quanto à ação dos bioestimulantes, as plantas em conforto hídrico não só apresentaram um desenvolvimento superior, como também mostraram valores fisiológicos superiores aos do Controlo na mesma modalidade hídrica. Nas plantas da modalidade CRH, os bioestimulantes mitigaram a interrupção do crescimento, promovendo o desenvolvimento contínuo, por vezes equiparando-se às plantas do Controlo em condições hídricas favoráveis. Embora, nem todos os parâmetros fisiológicos tenham aumentado significativamente, os resultados da aplicação

dos bioestimulantes foram consistentemente superiores aos do Controlo, nas mesmas condições hídricas.

Ainda nesta última fase, o tratamento Bio 5 apresentou, maioritariamente, os melhores resultados tanto morfológicamente como fisiologicamente, seguido pelo tratamento Bio 10 e, por fim, o tratamento Bio 2; todos superando o Controlo em ambas as modalidades hídricas.

Palavras-chave: défice hídrico, milho, bioestimulantes, fenotipagem digital de alto rendimento.

Abstract

Currently, climate change has led to a scarcity of water resources and a rising increase in temperatures. In this scenario of prolonged drought, considering that maize crop has high water needs and substantial economic interest, it becomes crucial to conduct studies concerning to water deficit irrigation to prevent its productivity from being affected. Thus, the main objective of this study was to evaluate through high-throughput digital phenotyping the effect of using microbial biostimulants in increasing plant tolerance to water stress.

In the first phase of this study, ten strains of bacteria with biostimulant effects were evaluated under two water regimes: without water restrictions (SRH) and with water restrictions (CRH). Three biostimulants that induced the highest plant tolerance to water stress were selected by the final biomass of the plants. It was observed that treatments Bio 2, Bio 5, and Bio 10 under SRH confirmed their biostimulant effect compared to the Control. Under CRH, these treatments also induced the highest biomass increment respectively 24%, 41%, and 21%, compared to the Control plants. Therefore, these treatments were selected for the next research phase.

In the subsequent phase, a comparative study was conducted among the three selected bacterial strains, using the same previous water regimes. Monitoring the tested maize plants through high-throughput digital phenotyping and final measurements (as biomass, Fv/Fm and plant nutrition) demonstrated that 50% of water reduction affect negatively plant growth, as observed in Control plants under CRH compared to Control plants under SRH. Regarding the action of the biostimulants, the plants without water restriction not only showed superior growth but also presented superior to the Control under the same water regime. In CRH plants, biostimulants mitigated growth interruption, promoting continuous development, sometimes similarly to Control plants no water restrictions. Although not all physiological parameters were significant higher then the Control plants with no water restriction, the results of biostimulant application were consistently superior to the Control under the same water conditions.

In this final phase, the Bio 5 treatment presented the best results both morphologically and physiologically, followed by Bio 10, and finally Bio 2; all surpassing the Control in both water regimes.

Keywords: water deficit, maize, biostimulants, high-throughput digital phenotyping.

Índice

Agradecimentos	I
Lista de Abreviaturas.....	II
Resumo.....	III
Abstract.....	V
Índice de Figuras.....	VIII
Índice de Quadros.....	XI
1. Introdução	1
2. Revisão bibliográfica	3
2.1. Descrição botânica do milho	3
2.2. Enquadramento socioeconómico do milho	3
2.3. Relações hídricas em plantas.....	5
2.3.1. Absorção radicular.....	6
2.3.2. Transpiração.....	7
2.3.3. Autorregulação da transpiração	8
2.4. As implicações da disponibilidade hídrica	9
2.4.1. Efeitos do défice hídrico	9
2.5. Utilização de bioestimulantes.....	11
2.5.1. Implicações dos bioestimulantes para a tolerância a stresses abióticos	12
2.6. Fenotipagem digital de alto rendimento.....	14
2.6.1. Ferramentas digitais para a avaliação por fluorescência	15
2.6.2. Ferramentas digitais para a geração de imagens na faixa do visível	15
2.6.3. Ferramentas digitais para a geração de imagens termográficas	16
2.6.4. Ferramentas digitais para geração de imagens na região infravermelha do espectro.....	17
3. Material e Métodos.....	18
3.1. Caracterização do local experimental	18
3.2. Material Vegetal	19
3.3. FASE I – Análise preliminar através de um <i>screening</i> de bactérias	20
3.3.1. Delineamento experimental	20
3.3.2. Registos climáticos.....	22
3.3.3. Implementação do ensaio.....	22
3.3.4. Aplicação de bioestimulantes.....	24
3.3.5. Variável observada.....	25
3.3.5.1. Biomassa final	25
3.3.6. Análise estatística	25
3.4. Fase II – Estudo comparativo de três bioestimulantes que induzem uma maior tolerância ao défice hídrico.....	25
3.4.1. Delineamento experimental	25
3.4.2. Registos climáticos.....	28
3.4.3. Implementação do ensaio.....	28

3.4.4.	Aplicação de bioestimulantes.....	28
3.4.5.	Observações e registros.....	29
3.4.5.1.	Fenotipagem digital.....	29
3.4.5.2.	Medição da fluorescência da clorofila <i>a</i>	31
3.4.5.3.	Diâmetro do caule.....	32
3.4.5.4.	Peso fresco e biomassa: da parte radicular e da parte aérea.....	33
3.4.5.5.	Análise ao material vegetal.....	33
3.4.6.	Análise estatística.....	34
4.	Resultados e Discussão	35
4.1.	FASE I – Análise preliminar através de um <i>screening</i> de bactérias.....	35
4.1.1.	Registro diário da temperatura e da humidade no interior da estufa.....	35
4.1.2.	Efeitos do défice hídrico.....	36
4.1.2.1.	Peso fresco da parte aérea.....	36
4.1.2.2.	Biomassa final da parte aérea.....	37
4.2.	Fase II – Estudo comparativo aprofundado de três bioestimulantes que induzem uma maior tolerância ao défice hídrico.....	39
4.2.1.	Registro diário da temperatura e da humidade no interior da estufa.....	39
4.3.1.	Efeitos do défice hídrico analisados através da fenotipagem digital.....	40
4.3.1.1.	Efeito do desenvolvimento da Área foliar.....	40
4.3.1.2.	Efeito no desenvolvimento da Altura da planta.....	42
4.3.1.3.	Parâmetro fisiológico: NDVI (Normalized Digital Vegetation Index).....	43
4.3.1.4.	Parâmetro fisiológico: NPCI (Normalized Pigments Chlorophyll Index).....	45
4.3.1.5.	Parâmetro fisiológico: GLI (<i>Green Leaf Index</i>).....	47
4.3.2.	Efeitos do défice hídrico analisados através das medidas finais.....	49
4.3.2.1.	Fluorescência modulada da clorofila <i>a</i>	49
4.3.2.2.	Peso fresco: da parte radicular e da parte aérea.....	51
4.3.2.3.	Biomassa total.....	53
4.3.2.4.	Razão da biomassa da parte radicular X Parte aérea (<i>Root-Shoot Ratio</i>).....	54
4.3.2.5.	Conteúdo de água presente nas folhas (<i>Leaf Water Content</i>).....	56
4.3.2.6.	Diâmetro do caule.....	58
4.3.2.7.	Análises de material vegetal.....	60
5.	Conclusão.....	62
6.	Referências bibliográficas	64
	ANEXOS.....	71

Índice de Figuras

Figura 1 – Estação Experimental “Kiplant Lighthouse”, sediada na empresa Asfertglobal, lda.	19
Figura 2 – Esquema Experimental. (+ : Sem Restrição Hídrica; – : Com Restrição Hídrica; \emptyset : Controlo; Bio 1 a 10 : diferentes bioestimulantes)	21
Figura 3 – Instalação do esquema experimental nas bancadas da estufa.	21
Figura 4 - Sensor utilizado para a medição da temperatura e da humidade interior da estufa, ao longo do ensaio.	22
Figura 5 - Representação dos vasos Sem Restrições Hídricas (Lado Esquerdo) e Com Restrições Hídricas (Lado Direito).	24
Figura 6 - Esquema Experimental.	27
Figura 7 – Equipamento TraitFinder (esquerda), Sensores PlantEye (direita).	30
Figura 8 – Fluorímetro Handy PEA+ (lado esquerdo); Clípes por onde é efetuado o pulso de luz sobre a área da folha exposta.	32
Figura 9 - Paquímetro digital usado para a medição final do diâmetro dos caules.	33
Figura 10 – Realização do Peso Fresco da Parte Radicular e da Parte Aérea (lado esquerdo), e colocação do material vegetal numa estufa ventilada para proceder-se à medição da biomassa (Lado direito).	33
Figura 11 - Dados climáticos referentes ao período de realização da fase I, do ensaio experimental. O tracejado vermelho indica o início da indução do défice hídrico.	35
Figura 12 - Efeito do défice hídrico no peso fresco da parte aérea das plantas de milho, por tratamento. As barras representam a média das plantas \pm Desvio Padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$). (A): Plantas SRH; (B): Plantas CRH.	36
Figura 13 - Efeito dos diferentes tratamentos, SRH e CRH, na biomassa final das plantas de milho. As barras representam a média das plantas \pm Desvio Padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$). (A): Plantas SRH; (B): Plantas CRH.	37
Figura 14 - Dados climáticos referentes ao período de realização da Fase Experimental II. O tracejado vermelho indica quando se iniciou a indução do défice hídrico.	39
Figura 15 – Efeito dos diferentes tratamentos em condições SRH, na Área Foliar das plantas de milho, ao longo do tempo. Os pontos representam a média das 8 plantas \pm Desvio Padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) e n.s representa não haver diferenças entre todos os tratamentos.	40
Figura 16 – Efeito dos diferentes tratamentos em condições CRH, na Área Foliar das plantas de milho, ao longo do tempo. Os pontos representam a média das 8 plantas \pm Desvio Padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) e n.s representa não haver diferenças entre todos os tratamentos.	40

Figura 17 - Efeito dos diferentes tratamentos em condições SRH, na Altura das plantas de milho, ao longo do tempo. Os pontos representam a média das plantas \pm Desvio Padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) e n.s representa não haver diferenças entre todos os tratamentos.	42
Figura 18 - Efeito dos diferentes tratamentos em condições CRH, na Altura das plantas de milho, ao longo do tempo. Os pontos representam a média das plantas \pm Desvio Padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) e n.s representa não haver diferenças entre todos os tratamentos.	42
Figura 19 - Efeito dos diferentes tratamentos em condições SRH, no NDVI das plantas de milho, ao longo do tempo. Os pontos representam a média das plantas \pm Desvio Padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) e n.s representa não haver diferenças entre todos os tratamentos.	43
Figura 20 - Efeito dos diferentes tratamentos em condições CRH, no NDVI das plantas de milho, ao longo do tempo. Os pontos representam a média das plantas \pm Desvio Padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) e n.s representa não haver diferenças entre todos os tratamentos.	44
Figura 21 - Efeito dos diferentes tratamentos em condições SRH, no NPCI das plantas de milho, ao longo do tempo. Os pontos representam a média das plantas \pm Desvio Padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) e n.s representa não haver diferenças entre todos os tratamentos.	45
Figura 22 - Efeito dos diferentes tratamentos em condições SRH, no NPCI das plantas de milho, ao longo do tempo. Os pontos representam a média das plantas \pm Desvio Padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) e n.s representa não haver diferenças entre todos os tratamentos.	45
Figura 23 - Efeito dos diferentes tratamentos em condições SRH, no GLI das plantas de milho, ao longo do tempo. Os pontos representam a média das plantas \pm Desvio Padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) e n.s representa não haver diferenças entre todos os tratamentos.	47
Figura 24 - Efeito dos diferentes tratamentos em condições CRH, no GLI das plantas de milho, ao longo do tempo. Os pontos representam a média das plantas \pm Desvio Padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) e n.s representa não haver diferenças entre todos os tratamentos.	47
Figura 25 - Efeito da ação dos diferentes tratamentos em condições SRH e CRH, na variação do rendimento quântico do PSII (F_v/F_m). Os resultados foram obtidos de 3 folhas de cada planta de milho. As barras representam a média das plantas \pm Desvio Padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas ($P < 0,05$). As percentagens representam os acréscimos/decrécimos dos tratamentos de bioestimulantes comparativamente ao tratamento Controlo, de cada modalidade. ...	49

Figura 26 - Efeito da ação dos diferentes tratamentos em condições SRH e CRH, no peso fresco das plantas de milho. As barras representam a média das plantas \pm Desvio Padrão. Em cada modalidade hídrica e por cada parte da planta, letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$). As percentagens representam os acréscimos/decréscimos dos tratamentos de bioestimulantes comparativamente ao tratamento Controlo, de cada modalidade.	51
Figura 28 - Comparação do efeito da ação dos diferentes tratamentos em condições sem restrições hídricas (SRH) e com restrições hídricas (CRH), no desenvolvimento da parte aérea das plantas de milho. A barra de escala vermelha indica 15 cm de comprimento em cada raiz.	53
Figura 27 - Comparação do efeito da ação dos diferentes tratamentos em condições sem restrições hídricas (SRH) e com restrições hídricas (CRH), no desenvolvimento da parte aérea das plantas de milho. A barra de escala vermelha indica 50 cm de comprimento em cada planta.....	52
Figura 29 - Efeito da ação dos diferentes tratamentos em condições SRH e CRH, Biomassa Total das plantas de milho. As barras representam a média das plantas \pm Desvio Padrão. Em cada regime hídrico, letras diferentes representam diferenças significativas ($P < 0,05$). As percentagens representam os acréscimos/decréscimos dos tratamentos de bioestimulantes comparativamente ao tratamento Controlo, de cada modalidade.....	53
Figura 30 - Efeito da ação dos diferentes tratamentos em condições SRH e CRH, na razão da Biomassa da Parte Radicular com a Biomassa da Parte Aérea, das plantas de milho. As barras representam a média das plantas \pm Desvio Padrão. Em cada regime hídrico, letras diferentes representam diferenças significativas ($P < 0,05$). As percentagens representam os acréscimos/decréscimos dos tratamentos de bioestimulantes comparativamente ao tratamento Controlo, de cada modalidade.	55
Figura 31 - Efeito da ação dos diferentes tratamentos em condições SRH e CRH, no conteúdo de água presente nas folhas das plantas de milho. As barras representam a média das plantas \pm Desvio Padrão. Em cada regime hídrico, letras diferentes representam diferenças significativas ($P < 0,05$). As percentagens representam os acréscimos/decréscimos dos tratamentos de bioestimulantes comparativamente ao tratamento Controlo, de cada modalidade.	56
Figura 32 - Efeito da ação dos diferentes tratamentos em condições SRH e CRH, no Diâmetro do Caule médio das plantas de milho. As barras representam a média das plantas \pm Desvio Padrão. Em cada regime hídrico, letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$). As percentagens representam os acréscimos/decréscimos dos tratamentos de bioestimulantes comparativamente ao tratamento Controlo, de cada modalidade.	58

Índice de Quadros

Quadro 1 – Características da variedade P 0937 (Fonte: Pioneer).....	19
Quadro 2 - Descrição dos principais parâmetros do delineamento experimental.	20
Quadro 3 - Descrição dos principais parâmetros do delineamento experimental.	26
Quadro 4 - Parâmetros da Fenotipagem Digital, calculados pelo Software HortControl, estudados e utilizados no decorrer do ensaio experimental. (Fonte: https://phenospex.helpdocs.com/plant-parameters/planteye-parameters).....	30
Quadro 5 – Efeito dos diferentes tratamentos em condições SRH e CRH, nas análises de material vegetal, através de amostras compostas.	60
Quadro 6 – Dados de significância da Análise de Variância (Two-way ANOVA) relativamente às variáveis dependentes: Peso Fresco e Peso Seco da Parte Aérea da FASE I experimental.	83
Quadro 7 - Dados de significância da Análise de Variância (repeated measurements ANOVA) relativamente às variáveis dependentes: Área Foliar e Altura das plantas da FASE II experimental.....	83
Quadro 8 - Dados de significância da Análise de Variância (ANOVA repeated measurements) relativamente às variáveis dependentes: NDVI, NPCI e GLI da FASE II experimental.....	83
Quadro 9 - Dados de significância da Análise de Variância (Split Plot ANOVA) relativamente às variáveis dependentes: Diâmetro do Caule, Peso fresco da parte radicular e da parte aérea e Biomassa total da FASE II experimental.	84
Quadro 10 - Dados de significância da Análise de Variância (Split Plot ANOVA) relativamente às variáveis dependentes: Root-Shoot, Conteúdo de Água nas folhas e F_v/F_m das plantas da FASE II experimental.....	84

1. Introdução

É amplamente reconhecido que as alterações climáticas representam um dos desafios mais prementes a nível mundial, exercendo sérios impactos nos ecossistemas terrestres, na saúde humana e, especialmente, na disponibilidade e qualidade da água. Essas mudanças constituem um significativo fator de risco, especialmente quando associadas a eventos extremos como períodos de cheias e de secas, cujas consequências são agravadas pelas vulnerabilidades locais e regionais.

Prevê-se que a agricultura seja um dos setores mais afetados, pois as alterações na temperatura do ar e na precipitação devem intensificar-se, reduzindo a disponibilidade dos recursos hídricos e ameaçando a segurança alimentar global. Diante do intenso crescimento da população mundial, urge desenvolver técnicas científicas e socioeconómicas que sustentem a agricultura, incluindo estratégias de tolerância à seca, para garantir alimentos em quantidade e qualidade, protegendo o meio ambiente e os seus ecossistemas (Rosenzweig e Tubiello, 2007).

A mudança climática global tende a reduzir a produtividade das culturas mais valiosas, como o milho, gerando um impacto negativo na aptidão ecológica (Foyer *et al.*, 2019). O interesse em novas metodologias para melhorar a eficácia na produção agrícola frente às adversidades climáticas tem aumentado. Neste contexto, o uso de produtos contendo inóculos de microrganismos tem-se destacado como uma estratégia biológica em desenvolvimento.

Esses microrganismos induzem mecanismos de resposta que ajudam as plantas a sobreviver sob *stress* biótico e abiótico, incluindo o *stress* hídrico, promovendo o crescimento e o desenvolvimento vegetal (Yadav e Yadav, 2018). Aliada à identificação das soluções mais adequadas para aumentar a resistência das plantas aos stresses abióticos, surge a fenotipagem digital de alto rendimento que se tem destacado como uma abordagem que oferece uma maior eficiência, precisão nos resultados e uma maior coleção de dados num curto prazo, atendendo à necessidade constante de monitorizar o desenvolvimento das plantas diante das adversidades climáticas. (Araus *et al.*, 2022)

É dentro desse contexto que este estudo visa contribuir para (i) avaliar a eficácia dos bioestimulantes microbianos na tolerância da cultura do milho ao stress hídrico e (ii) analisar

a eficácia da fenotipagem digital de alto rendimento na avaliação do efeito desses bioestimulantes na tolerância das plantas de milho ao stress hídrico.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Descrição botânica do milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma espécie que pertence à família Gramineae/Poaceae, com origem no teosinto, há mais de 8000 anos e que é cultivada em muitas partes do Mundo englobando os cinco continentes (Barros, 2014).

O milho é considerado uma espécie altamente variável, apresentando populações que amadurecem em tempos bastante distintos: algumas são muito precoces, atingindo a maturação em apenas 60 a 70 dias, enquanto outras são muito tardias, levando de 10 a 11 meses para maturar. As características morfológicas das plantas também variam amplamente, com o número de folhas por planta a oscilar entre 8 e 48, a altura do caule podendo variar de 60 centímetros a 6 metros, e o tamanho das espigas entre 2,5 e 30 centímetros.

Apesar dessas variações, todas as variedades de milho cultivado partilham certas características morfológicas, especialmente em relação aos órgãos vegetativos (como raízes, caule e folhas) e órgãos reprodutivos (como a panícula e as espigas).

O milho, possui dois sistemas radiculares: um seminal e um coronário. As raízes seminais são as primeiras a formar-se, permitindo que a planta vá desenvolver-se até formar as raízes coronárias, as quais permitem também fixar a planta ao solo. O caule é composto por uma série de nós e entrenós, com o número de nós a variar entre 8 e 48. Em cada nó, encontra-se inserida uma folha e um gomo axilar. Quando os gomos axilares na base do caule se desenvolvem, dão origem a novos rebentos que, tal como o caule principal, são constituídos por caule, folhas e inflorescências. E, por fim, as folhas do milho apresentam tamanhos diversos. As folhas mais próximas da base são menores e, devido ao engrossamento do caule, acabam por romper os vasos que as alimentam, tornando-se assim não funcionais. As folhas situadas na parte mediana do caule (perto da inserção das espigas) são as maiores em comprimento e largura. No terço superior do caule, as folhas tornam-se progressivamente menores à medida que se aproximam da panícula. (Cruz, 2006)

2.2. Enquadramento socioeconómico do milho

Devido à grande adaptabilidade da cultura do milho, representada por uma ampla variedade de genótipos, é possível o seu cultivo desde o Equador até ao limite das terras temperadas e desde o nível do mar até altitudes superiores a 3600 metros, abrangendo climas

tropicais, subtropicais e temperados. Nenhuma outra cultura apresenta uma distribuição geográfica tão extensa.

No contexto agrícola português, o milho destaca-se como uma das culturas arvenses mais relevantes, envolvendo o maior número de explorações agrícolas. De acordo com a Associação Nacional de Produtores de Milho e Sorgo, desde 2006, o milho tem ocupado uma área entre 130 e 150 mil hectares em todo o país. É uma cultura associada tanto à produção de silagem de elevada qualidade quanto à produção de grão, afirmando-se atualmente como uma cultura com grande potencial produtivo na agricultura de regadio em Portugal, desempenhando um papel significativo na vitalidade das economias regionais e nacional. (Barros, 2014)

Segundo dados do INE, nos últimos 10 anos os níveis de produtividade por hectare mantiveram-se relativamente estabilizados (tanto no milho forrageiro, como no milho em grão). Sendo que, a produtividade por hectare do milho forrageiro com uma média de 39 toneladas/hectare nos últimos 5 anos, é claramente superior à do milho em grão com uma média de 8,9 toneladas/hectare no mesmo período (INE, 2021).

Em Portugal, ao longo dos últimos 10 anos, a área cultivada teve uma redução de 20,5%, tendo sido uma das principais razões para a queda do grau de autoaprovisionamento neste período. Na produção forrageira, a região Entre Douro e Minho e a região dos Açores são as mais representativas, já na produção para grão, as principais regiões são o Ribatejo-Oeste e a Beira Litoral (INE, 2021).

No que respeita ao Comércio Internacional de Milho, devido ao facto do país ser deficitário na produção de milho para satisfazer o consumo interno, a balança comercial apresentou-se sempre negativa entre 2012 e 2021, com um valor negativo de -412,9 Milhões de Euros (INE, 2021). Os principais países de onde importamos milho, por ordem decrescente, são a Ucrânia (38%), seguido do Brasil (26%), a Roménia (12,9%), o Canadá (7,4%), a Sérvia (5%), e o restante disperso por vários outros países com peso mais reduzido. Em termos das exportações de milho, cerca de 98% das nossas exportações são direcionadas para Espanha.

Cerca de 95% do consumo de milho em Portugal, na campanha 2019/20 teve como destino a alimentação animal (fabricação de rações), e apenas 5% direcionado para o consumo humano.

Relativamente às cotações, a conjuntura mundial da pandemia teve um impacto significativo no aumento dos preços após o mês de agosto de 2020. Para além disso, o conflito militar Rússia-Ucrânia, que ocorre desde fevereiro de 2022, também já está a gerar impactos significativos na subida das cotações, por se prever um cenário futuro de possível redução da oferta desta matéria-prima, sendo expectável uma subida do preço nos mercados internacionais (US Department of Agriculture; World Bank).

2.3. Relações hídricas em plantas

A água desempenha uma função crucial nas plantas, sendo fundamental para a dissolução e transporte de iões e moléculas, além de influenciar a estrutura de proteínas, ácidos nucleicos, polissacáridos e outros constituintes da membrana celular. Constitui um meio no qual a maioria das reações celulares ocorre e participa diretamente em várias reações químicas, como a fotossíntese, a respiração celular e a síntese de compostos orgânicos essenciais. Além disso, a água é essencial para a manutenção da turgescência celular, uma condição necessária para o crescimento e a manutenção da estrutura das plantas. (Cruz, 2006)

Este líquido, é o componente maioritário das plantas, constituindo cerca de 80 a 95% da massa dos tecidos vegetais em crescimento. Contudo, em estruturas como a madeira, que é composta predominantemente por células mortas, o teor de água é significativamente menor, o que contribui para a rigidez estrutural. A maior parte da água absorvida pelas plantas é utilizada na transpiração, um processo que ocorre através da abertura dos estomas para permitir a entrada de dióxido de carbono necessário para a fotossíntese. Esta perda de água por transpiração também ajuda a regular a temperatura das folhas e a manter o fluxo de nutrientes através do xilema.

A absorção de água pelas raízes das plantas ocorre através de duas vias principais: a via apoplástica, onde a água se move passivamente através das paredes celulares e dos espaços intercelulares, e a via simplástica, que envolve o movimento da água pelo citoplasma das células, conectadas por plasmodesmos. No caso das células, a difusão de água através de membranas, designa-se por osmose dependendo de um gradiente de energia livre da água através da membrana, normalmente medido como diferença de potencial hídrico.

O potencial hídrico (Ψ_w) é um indicador fundamental do estado hídrico da planta e pode ser definido pela soma de três componentes: o potencial osmótico (Ψ_s), que reflete a redução do potencial de água devido à presença de solutos; a pressão de turgescência ou pressão hidrostática (Ψ_p), que é a pressão exercida pela água contra as paredes celulares; e

o efeito da gravidade (Ψ_g), que afeta o movimento de água em plantas altas, aumentando cerca de 0,1 MPa a cada 10 metros de altura. Em condições de stress hídrico, as plantas podem ajustar o seu potencial hídrico através do acúmulo de solutos compatíveis, como prolina e glicina betaína, que ajudam a manter a turgescência e a estabilidade das membranas celulares. (Cruz, 2006)

Além disso, a eficiência no uso da água é uma característica importante em muitas espécies de plantas, especialmente em ambientes áridos. Algumas plantas desenvolveram adaptações, como a capacidade de fechar os estomas durante o dia para reduzir a perda de água ou armazenar água em tecidos especializados. Outras, utilizam mecanismos de fotossíntese alternativos, como o metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) ou a fotossíntese C₄, que são mais eficientes no uso da água do que o caminho fotossintético C₃ tradicional.

Essas adaptações e processos sublinham a importância crítica da água não apenas para a sobrevivência das plantas, mas também para a sua produtividade e resiliência em diferentes condições ambientais.

2.3.1. Absorção radicular

A entrada de água nas plantas ocorre através das raízes em resposta ao gradiente de potencial hídrico no xilema, que é estabelecido pelo processo de transpiração. A velocidade com que a água é absorvida varia conforme a resistência oferecida pelas raízes; raízes que apresentam menor resistência permitem uma absorção mais rápida. Esse fenômeno é influenciado por diversos fatores, incluindo a espécie da planta, a sua idade, e condições específicas como a enxertia, que geralmente aumenta a resistência das raízes à passagem de água (Faust, 1989 citado em Azevedo, 2006).

Recentemente, foi desenvolvido um modelo que permite estimar a quantidade de água extraída do solo pelas plantas. Este modelo considera que a quantidade de água retirada é proporcional ao produto da diferença entre o potencial hídrico foliar e o potencial hídrico do solo, a densidade do sistema radicular e a condutância global. Em termos práticos, isso significa que a taxa de extração de água do solo para compensar as perdas de água por transpiração é diretamente proporcional à diferença de potencial hídrico entre as raízes e o solo, assim como à densidade do sistema radicular e à condutância hidráulica entre a raiz e o solo (Azevedo, 2006).

Este modelo proporciona uma forma de calcular o consumo de água pelas plantas, expresso em metros cúbicos de água por hora por metro quadrado de secção de tronco. A sua aplicação é especialmente útil na gestão da irrigação agrícola, permitindo ajustar o fornecimento de água com base nas necessidades específicas de diferentes plantas, suas características radiculares, e condições do solo. Além disso, a compreensão deste modelo pode ajudar a otimizar a utilização da água, um recurso cada vez mais escasso, especialmente em regiões sujeitas a seca ou stress hídrico.

Adicionalmente, o estudo da condutância hidráulica e da densidade do sistema radicular também tem implicações na seleção de espécies ou variedades mais resistentes à seca. Plantas com sistemas radiculares densos e uma eficiente condutância hidráulica são geralmente mais eficazes na extração de água de solos secos, apresentando maior resistência a condições de escassez de água. (Cook *et al.*, 2006 citado em Azevedo, 2006)

2.3.2. Transpiração

A absorção de grandes quantidades de água pelas plantas a partir do solo, o seu transporte através dos tecidos e a subsequente perda de vapor de água para a atmosfera ocorrem principalmente devido ao processo de transpiração. Nas folhas, a água é transportada para as células epidérmicas pelos tecidos condutores (xilema) e, em seguida, difundida para a atmosfera através dos estomas. Dessa forma, o funcionamento dos estomas desempenha um papel essencial na regulação da transpiração (Marro, 1981 citado em Azevedo, 2006).

A taxa de transpiração por unidade de área foliar é influenciada por fatores físicos que afetam a evaporação, como a intensidade da luz solar, a temperatura ambiente, a humidade relativa do ar, e a velocidade do vento. Além disso, a taxa de transpiração depende do grau de abertura dos estomas, que são pequenos poros na superfície das folhas (Jackson, 2003). Os estomas são formados por uma abertura que comunica com o exterior, cercada por duas células guarda. Quando ocorre um aumento da pressão osmótica nas células guarda, geralmente devido à entrada de iões potássio (K^+), a água é atraída para essas células por osmose, aumentando a sua turgescência. Quando as *células guarda* se tornam túrgidas, suas paredes celulares mais espessas curvam-se para fora, abrindo o poro estomático e permitindo uma maior transpiração. Quando a pressão osmótica diminui, as *células guarda* perdem água, tornando-se flácidas, o que resulta no fecho dos estomas e, conseqüentemente, na redução da transpiração (Kaiser, 2001 citado em Azevedo, 2006).

Entre os fatores que regulam a abertura e o fecho dos estomas, destacam-se a intensidade luminosa, a concentração de dióxido de carbono (CO_2) e a temperatura do ar. A luz estimula a abertura dos estomas, pois ativa bombas de íons nas células guarda, enquanto altas concentrações de CO_2 e temperaturas extremas podem levar ao fecho dos estomas para evitar a perda excessiva de água (Tromp, 2005). Além disso, a disponibilidade de água no solo e a presença de hormonas vegetais como o ácido abscísico (ABA) também são cruciais na regulação estomática. Em condições de seca, o aumento da concentração de ABA nas folhas promove o fecho dos estomas para conservar água, mostrando a complexidade e importância do controlo da transpiração para a sobrevivência das plantas em diferentes condições ambientais.

2.3.3. Autorregulação da transpiração

A transpiração nas plantas é controlada principalmente pela abertura e fecho dos estomas, pequenos poros localizados na superfície das folhas. A luz é o fator determinante na regulação estomática, o que faz com que os estomas se abram ao amanhecer e se fechem ao anoitecer. Durante o dia, a abertura dos estomas varia, sendo geralmente máxima pela manhã. No entanto, os estomas tendem a fechar-se não só durante a noite, mas também nas primeiras horas da tarde, quando o déficit de pressão de vapor (DPV) do ar é elevado, reduzindo a perda de água pela planta (Torres-Pereira, 1984 citado em Azevedo, 2006).

Com o aumento da luminosidade ao amanhecer, ocorre uma rápida diminuição do potencial hídrico foliar (Ψ_f) devido à abertura dos estomas para permitir a entrada de dióxido de carbono necessário para a fotossíntese. O Ψ_f começa a aumentar gradualmente após o meio-dia, à medida que a tarde avança, mas geralmente é mais negativo ao anoitecer do que ao amanhecer. Durante a noite, o Ψ_f atinge progressivamente o seu valor máximo (menos negativo) diário, pois ocorre o equilíbrio com o potencial hídrico do solo (Smart, 1974). Segundo o mesmo autor, o valor máximo do Ψ_f é alcançado antes do amanhecer, quando a planta atinge o equilíbrio hídrico com o solo.

O fecho dos estomas também pode ser induzido por um elevado DPV, mesmo em folhas que ainda estejam bem túrgidas. Adicionalmente, quando as plantas enfrentam um déficit hídrico no solo, podem sintetizar ácido abscísico (ABA) nas raízes que estão em processo de desidratação. Este hormônio é transportado pelo xilema até às folhas, onde atua para fechar os estomas, evitando a perda de água. Este mecanismo pode ocorrer mesmo quando não é evidente um déficit hídrico nas folhas, funcionando como uma resposta

antecipada para preservar a água, permitindo que as plantas maximizem a sua sobrevivência em condições de baixa disponibilidade de água no solo (Azevedo, 2006).

Essa resposta de proteção ao nível foliar, desencadeada por fatores que causam stress, tem como objetivo prevenir danos irreversíveis ao metabolismo fotossintético. Quando o déficit hídrico aumenta, a condutância estomática diminui rapidamente, o que leva a um aumento da eficiência do uso da água (EUA) pela planta, ou seja, a planta consegue manter a fotossíntese enquanto reduz a perda de água (Chaves *et al.*, 2004).

Este fenómeno tem gerado interesse na comunidade científica, incentivando o desenvolvimento de novas técnicas de irrigação que visam maximizar a eficiência do uso da água. Técnicas como a irrigação deficitária controlada e a irrigação de precisão são exemplos de abordagens que permitem ajustar a quantidade de água aplicada às necessidades reais das plantas, minimizando o desperdício e melhorando a resiliência das culturas a períodos de seca.

2.4. As implicações da disponibilidade hídrica

A reduzida disponibilidade de água é um dos fatores ambientais com mais relevância na regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas e uma das principais causas para a redução do rendimento das colheitas que afetam a maioria das zonas cultivadas por todo o mundo (Bruce *et al.*, 2002).

De acordo com Larcher (2004), a falta de água irá provocar perturbações nas condições ótimas ao desenvolvimento das culturas, provocando mudanças e respostas funcionais do organismo. Tal, pode tornar-se irreversível ao longo do tempo. Poderá considerar-se que haja um *stress* hídrico quando o ambiente apresenta um período prolongado sem precipitações desejáveis de tal modo que, o volume de água armazenado no solo é reduzido, e consequentemente as plantas irão sofrer com a carência de água.

2.4.1. Efeitos do déficit hídrico

Devido ao déficit hídrico no solo as plantas de milho apresentam crescimento e desenvolvimento limitado, o que pode comprometer tanto a produção como a qualidade dos alimentos produzidos (Brito *et al.*, 2011).

Vários estudos foram conduzidos com o intuito de examinar os efeitos da falta de água no rendimento de grãos e identificar os períodos em que a cultura do milho é mais vulnerável à escassez hídrica. O rendimento máximo de grãos de uma cultura depende principalmente das suas características genéticas, das respostas às condições ambientais

predominantes, bem como das práticas de manejo adotadas. Como a carga genética varia entre as diferentes cultivares, é importante escolher variedades que sejam mais adaptadas às condições específicas do solo e do clima da região de cultivo (Farias, 2011 citado em Cruz, 2006).

A primeira resposta das plantas ao déficit hídrico é a perda de turgescência, que representa a perda de pressão interna nas células. Este é o sinal inicial e mais sensível ao stress hídrico. Na sequência, ocorrem alterações no metabolismo, incluindo uma redução na síntese de proteínas e aminoácidos, bem como a inibição da atividade do nitrato redutase, uma enzima essencial para a assimilação do nitrogênio. A interrupção da síntese de proteínas, por sua vez, causa a paragem da divisão celular, afetando diretamente o crescimento das plantas. Como consequência imediata da redução da turgescência, o crescimento das plantas é prejudicado, levando a uma diminuição da área foliar. Em muitas espécies, a falta de água reduz a expansão das folhas e o crescimento do caule, mas frequentemente estimula o alongamento das raízes. Este aumento proporcional do crescimento radicular em relação ao crescimento da parte aérea é considerado uma adaptação evolutiva que permite às plantas explorar melhor o solo em busca de água em condições de seca, em vez de ser apenas uma restrição fisiológica ao crescimento (Cruz, 2006).

A fotossíntese, um dos processos vitais para o crescimento e desenvolvimento das plantas, é também significativamente afetada pelo déficit hídrico. Este impacto ocorre de duas maneiras principais: pela diminuição da difusão de dióxido de carbono (CO_2) para os cloroplastos devido ao fecho dos estomas, e pelas limitações metabólicas associadas ao stress hídrico. A severidade deste impacto varia de acordo com a intensidade do stress a que a planta é submetida. Com o fecho dos estomas para conservar a água, o fluxo de CO_2 para o interior das folhas é restringido, o que diminui a taxa de fotossíntese. Ao mesmo tempo, o fecho dos estomas reduz a transpiração, limitando a perda de água para a atmosfera (Bergamaschi e Matzenauer, 2014).

O ácido abscísico (ABA), uma hormona vegetal produzida em resposta ao déficit hídrico, desempenha um papel crucial na regulação do fecho dos estomas. Além disso, a síntese de ABA nas folhas e raízes desencadeia uma série de mudanças na distribuição de assimilados entre as partes aérea e radicular da planta. Essas alterações hormonais podem promover o desenvolvimento de características morfológicas específicas e antecipar o início do processo reprodutivo. Sob condições de desidratação severa, os processos catabólicos tornam-se predominantes, acelerando a senescência das folhas, o que pode levar

à dessecação e posterior abscisão das folhas mais velhas (Larcher, 2004 citado em Cruz, 2006).

As consequências a longo prazo, irão comprometer os rendimentos da cultura. É possível verificar-se a ocorrência da dessecação dos estilos-estigmas, aborto dos sacos embrionários, distúrbios na meiose, morte dos grãos de pólen e aborto das espiguetas. Já durante o enchimento dos grãos, tendo em conta que os processos básicos do metabolismo foram afetados e considerando o fecho dos estomas, resulta-se uma diminuição na taxa fotossintética (Cruz, 2006). Geralmente, o número de espigas por planta e o número de grãos por espiga são os componentes da produção de grãos mais prejudicados pelo défice hídrico, quando este ocorre durante o período crítico.

2.5. Utilização de bioestimulantes

Os bioestimulantes de plantas são produtos constituídos por compostos naturais e/ou microrganismos que estimulam o crescimento das plantas melhorando uma ou mais das seguintes funções: tolerância ao stress abiótico, eficiência no uso dos nutrientes e características de qualidade da cultura (Rouphael e Colla, 2018; Li *et al.*, 2022).

Os bioestimulantes podem ser classificados de acordo com a sua composição, podendo ser de origem não microbiana (i a iv) e/ou de origem microbiana (v):

- (i) Hormonas vegetais: auxinas, giberelinas, citocininas, etileno e ácido abscísico;
- (ii) Aminoácidos: recomendado para situações de stresses abióticos, tais como a falta de água, temperaturas extremas e salinidade. Como por exemplo, a prolina, as poliaminas e a arginina que diminuem as consequências dessas ocorrências, devido ao facto de colaborarem na assimilação do nitrogénio.
- (iii) Substâncias húmicas: compostas principalmente, pelas frações de ácidos fúlvico, húmico e humina.
- (iv) Extrato de algas: algumas espécies de algas são conhecidas por auxiliarem na fixação do nitrogénio nas plantas e no controle do pH do solo. Também são uma ótima alternativa para que o cultivar tenha resistência garantida em períodos extremos do clima.
- (v) Microrganismos: são organismos promotores do crescimento das plantas, tais como fungos micorrízicos e bactérias da rizosfera ou filosfera, sendo as mais estudadas e utilizadas as pertencentes aos géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum* e *Rhizobium* (Yakhin *et al.*, 2017).

O bioestimulante pode, em função da sua composição, concentração e proporção das substâncias que o compõe, incrementar o crescimento e desenvolvimento vegetal ao ativar processos fisiológicos e moleculares que estimulam a divisão celular, diferenciação e o alongamento das células, podendo também aumentar a absorção e a utilização de água e nutrientes pelas plantas. Podem, ainda, ser aplicados diretamente nas plantas, promovendo alterações nos processos vitais e estruturais, possibilitando incrementos no teor de sacarose, na precocidade de maturação e no aumento da produtividade das culturas (Rouphael e Colla, 2018). A aplicação de bioestimulantes microbianos e não microbianos pode influenciar significativamente. Ao mesmo tempo, a aplicação de bioestimulantes pode induzir a tolerância a diversos stresses bióticos e abióticos em culturas agrícolas, como é o caso do stress hídrico.

Contudo, esta aplicação ainda possui um entusiasmo acrítico, podendo resultar numa adoção indiscriminada dos mesmos sem uma compreensão completa das suas limitações e variabilidades de eficácia. Entre os fatores que contribuem por vezes para uma visão demasiado otimista estão o marketing enfatizado, a variabilidade dos resultados dependendo de condições específicas como, o tipo de solo e o tipo de clima, a falta de regulamentação rigorosa sobre a qualidade dos produtos, e a crescente pressão para alternativas ambientais mais sustentáveis. Ou seja, embora os bioestimulantes possuam um grande potencial para melhorar o crescimento das plantas e aumentar a resistência ao stress, é necessário adotar uma abordagem crítica, fundamentada em evidências científicas, para evitar o uso indiscriminado e garantir resultados consistentes e eficazes.

2.5.1. Implicações dos bioestimulantes para a tolerância a stresses abióticos

Os mecanismos de ação dos bioestimulantes, tanto microbianos quanto não microbianos, em plantas submetidas a condições de stress abiótico ainda não estão completamente compreendidos. No entanto, alguns dos possíveis mecanismos incluem a síntese de osmoprotetores, exo-polissacarídeos, a produção da enzima ácido 1-aminociclopropano-carboxílico (ACC) deaminase, a regulação de fito-hormonas e a melhoria na disponibilização de nutrientes para as plantas (Egamberdieva *et al.*, 2017). Além disso, os bioestimulantes podem ativar e regular diferentes mecanismos de defesa na planta contra condições de stress (Rai *et al.*, 2021).

Alguns estudos sugerem que os bioestimulantes também podem atuar como agentes de “priming” para a planta, o que significa que eles desencadeiam uma série de mecanismos moleculares e fisiológicos de defesa que aumentam a capacidade da planta de se proteger contra diversos tipos de stress. Este efeito de “priming” pode incluir a modulação de enzimas do sistema antioxidante, ajudando as plantas a lidarem mais eficazmente com a produção de espécies reativas de oxigênio (Shukla *et al.*, 2019). As mudanças moleculares e celulares induzidas por estes agentes de priming são "memorizadas" pela planta, permitindo uma resposta mais rápida e eficaz a stresses futuros (Nephali *et al.*, 2020).

Os microrganismos, em particular, desempenham um papel fundamental na resistência das plantas ao stress hídrico e outros tipos de stress abiótico. Contudo, o sucesso na implementação de microrganismos benéficos na agricultura depende significativamente do desenvolvimento de formulações comerciais eficientes de inóculos microbianos (Bashan *et al.*, 2014). Diversas estirpes de bactérias, como *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Bacillus* e *Pseudomonas*, isoladas de solos com condições adversas (alcalinos, salinos, áridos e ácidos), têm demonstrado um grande potencial para se adaptar a estas condições extremas e ajudar a mitigar o impacto do stress abiótico nas plantas, podendo funcionar como bioestimulantes naturais.

Por exemplo, a inoculação de bioestimulantes microbianos diretamente nas raízes do solo ou através do revestimento de sementes pode induzir mudanças significativas na planta, como a alteração da composição das paredes celulares. Além disso, esses microrganismos podem produzir exo-polissacarídeos que formam um biofilme protetor na superfície das raízes, aumentando a acumulação de solutos osmóticos. Este biofilme atua como uma barreira que contribui para a retenção de água e aumenta a tolerância da planta a stress hídrico, iônico ou osmótico causados pela salinidade (Egamberdieva *et al.*, 2017).

Os bioestimulantes desempenham, portanto, funções benéficas e protetoras cruciais para as plantas expostas a uma ampla gama de stresses ambientais, como seca, salinidade e temperaturas extremas. Estas funções são essenciais para garantir a sobrevivência e o rendimento das culturas em condições adversas, ajudando a melhorar a resiliência agrícola e a sustentabilidade. Adicionalmente, o uso de bioestimulantes pode contribuir para a redução da dependência de fertilizantes e produtos químicos tradicionais, promovendo uma abordagem mais ecológica e sustentável para a agricultura. Com o aumento das preocupações globais em relação às mudanças climáticas e à disponibilidade de água, a investigação sobre bioestimulantes e o seu potencial para mitigar os efeitos do stress abiótico é cada vez mais relevante.

2.6. Fenotipagem digital de alto rendimento

No sentido de caracterizar e compreender as respostas das plantas a produtos aplicados e a condições ambientais recorre-se à fenotipagem de plantas que consiste na avaliação de diversas características das plantas relacionadas com o crescimento, desenvolvimento, fisiologia, produtividade e tolerância a stresses abióticos e bióticos (Walter *et al.*, 2015). Os recentes desenvolvimentos tecnológicos têm permitido a emergência de fenotipagem de plantas baseada na análise não destrutiva de imagens e na gestão e modelação de dados, desempenhando uma ação importante na avaliação rápida e precisa dos fenótipos (Costa *et al.*, 2019). As reproduções visuais geradas graças a esta recente tecnologia, depois de processadas, permitem a estimativa da altura, da largura, do número de folhas, do ângulo de inserção das folhas, da área foliar individual e da área projetada da parte aérea das plantas.

Com base nas variáveis anteriores, é possível, a estimativa da massa da parte aérea das plantas e a determinação do acúmulo de biomassa para cada fase de crescimento em centenas de plantas, simultaneamente, algo que não é possível usando o tradicional método destrutivo. Essas imagens são obtidas nas mesmas plantas a intervalos de tempo regulares no decorrer do período de cultivo, podendo ser usadas para avaliar a taxa de crescimento expressa em área, massa ou altura, o que permite a obtenção de vários parâmetros fenotípicos relacionados ao crescimento, à produção (partição de assimilados) e à tolerância aos stresses (relação parte aérea/raiz, por exemplo). O estudo do sistema radicular é uma das tarefas mais complexas visto que é um órgão subterrâneo e adere firmemente ao seu substrato. Contudo, em anos recentes, foram desenvolvidos estudos para a avaliação não destrutiva do sistema radicular por meio de imagens com o uso de diferentes técnicas (Borém, 2020).

Na fenotipagem digital de alto rendimento recorre-se a interações entre sensores e análise de dados envolvendo automação, “machine learning” e tratamento de “big data” (Costa *et al.*, 2019).

A eficácia das tecnologias de alto rendimento, permitem analisar as características de milhares de plantas por dia, através de câmaras e sensores que se deslocam sobre as plantas, permitindo obter uma visão 3D com o auxílio de imagens multiespectrais, calculando um amplo conjunto de parâmetros morfológicos e fisiológicos automaticamente e em tempo real. Estas análises podem comprovar a extrema importância do uso de bioestimulantes nos tempos que decorrem, permitindo auxiliar os produtores a adaptar os seus sistemas agrícolas às alterações climáticas, enquanto aumentam a sustentabilidade da produção de alimentos,

contribuindo para uma agricultura “inteligente” e resiliente do ponto de vista climático (De Diego & Spíchal, 2022).

2.6.1. Ferramentas digitais para a avaliação por fluorescência

A premissa básica de se medir a fluorescência da clorofila, ao invés de outros pigmentos como forma de avaliar as plantas, é que todos os tipos de stresse bióticos e/ou abióticos interferem no processo fotossintético, no qual as clorofilas desempenham um papel fundamental. Assim, é possível a avaliação precoce dos impactos causados sobre as plantas, antes do aparecimento de sintomas visuais (Chaerle *et al.*, 2007).

A técnica de avaliação da fluorescência da clorofila (método do pulso de saturação) permite determinar o destino da energia luminosa absorvida pelas plantas entre as três vias possíveis: fluorescência, fotoquímica e geração de calor, além de possibilitar o cálculo de diversos parâmetros que podem ser usados para avaliar características específicas, tais como: o funcionamento da antena utilizada para a captura da energia luminosa, o centro de reação do fotossistema II, a fixação de carbono e o rendimento quântico do transporte de elétrons no fotossistema II. É uma técnica que tem sido utilizada para avaliação das plantas sob os mais diferentes stresses abióticos, desde a escassez ao excesso de água, extremos de temperatura e intensidade de radiação luminosa, escassez ou excesso de nutrientes, ao efeito de herbicidas e bióticos, incluindo infecções causadas por fungos e vírus.

2.6.2. Ferramentas digitais para a geração de imagens na faixa do visível

Na faixa espectral visível (400-700 nm), existem vários modelos de câmaras multi e hiperespectrais no mercado e utilizadas para a captura de imagens da parte aérea das plantas em plataformas de fenotipagem. O uso dessa tecnologia justifica-se pelo facto de que todas as moléculas de pigmentos que absorvem radiação no visível (VIS) do espectro são passíveis de ter os seus teores estimados pelo método não destrutivo de sensoriamento remoto. Apesar de ser uma fração dos metabolitos presentes numa folha, os pigmentos têm importância na captura da luz na faixa VIS. As moléculas alvo-principal são os pigmentos que estão nos cloroplastos e ligados à fotossíntese, como as clorofilas e os carotenoides (carotenos e xantofilas), ou à proteção do processo fotoquímico, como as antocianinas, localizadas no vacúolo. Os teores de clorofilas são utilizados para avaliar o *status* de nutrientes nas plantas e, juntamente com os carotenoides, para monitorar a fenologia foliar e avaliar os efeitos provocados por diferentes tipos de stresses, enquanto as xantofilas servem para avaliar a eficiência fotossintética. As antocianinas que se acumulam nas folhas em resposta aos mais

variados tipos de stresses, previnem a fotoinibição do processo fotoquímico através da absorção do excesso de radiação. Os teores de clorofila, associados ao caráter sempre verde e ao atraso na senescência foliar são correlacionados a um estado hídrico mais favorável e ao rendimento das culturas. Tendo por base a refletância na região do espectro eletromagnético da região visível em que os pigmentos absorvem mais fortemente a radiação, foram desenvolvidos índices para monitorizar a fenologia, as condições fisiológicas e a deficiência de nutrientes, especialmente o azoto.

O mais conhecido e utilizado é o índice de vegetação por diferença normalizada (NDVI): $NDVI = (NIR - RED) / (NIR + RED)$, que se baseia na reflectância do visível (vermelho) e na banda adjacente ao visível *Near-Infrared* (NIR). Os valores dessa relação podem variar de -1 a +1. Quanto maior essa relação, maior a presença de clorofila e maior a atividade fotossintética. A proporção entre clorofila *a* e outros pigmentos pode ser estimada pelo NPCI (*Normalized Pigments Chlorophyll ratio Index*): $NPCI = (RED - BLUE) / (RED + BLUE)$. Usado tanto para monitoramento da fenologia foliar quanto para a avaliação de folhas submetidas a stresses abióticos. Outro parâmetro derivado dos teores de pigmentos componentes da antena que capta a radiação luminosa é o índice de refletância fotoquímica PRI: $PRI = (R531 - R570) / (R531 + R570)$. A variação na reflectância a 531nm deve-se ao ciclo das xantofilas, enquanto a reflectância a 570nm é usada para corrigir possíveis distorções no espalhamento da luz provocada pela estrutura foliar. O PRI pode ser explorado como um indicador da eficiência do uso da radiação fotossintética em plantas cultivadas ao ar livre, pois correlaciona-se com a absorção líquida de CO₂ (Muazen, 2020 citado em Prado, 2023).

2.6.3. Ferramentas digitais para a geração de imagens termográficas

Sistemas que geram imagens térmicas na região infravermelha (IV) do espectro eletromagnético operam nas faixas de comprimento de onda de 3-5 μm ou 7-13 μm. Mas, atualmente, na maioria das experiências que avaliam plantas, são utilizadas câmaras térmicas que captam uma radiação emitida entre 8-14 μm. Devido aos recentes avanços obtidos no desenvolvimento de softwares para a captura, produção e processamento de imagens, a utilização de câmaras termográficas pode ser considerada como uma alternativa viável para a medição em larga escala da temperatura das copas em ensaios de laboratório e/ou no campo com eficiência similar, desde que se adotem os devidos cuidados durante a medição. Frequentemente, as imagens térmicas têm sido usadas em investigações científicas como sensores para o monitoramento do estado hídrico das plantas em sistemas automatizados de

irrigação ou até para a seleção de plantas tolerantes ao *stress* salino e ao déficit hídrico. Essa aplicação tem como princípio os mecanismos de abertura e fecho dos estomas, sendo essa a primeira linha de defesa das plantas contra a perda de água, regulando a temperatura foliar. Ou seja, as imagens termográficas das folhas, possibilitam uma correlação do estado hídrico da planta, com o grau de abertura estomática e a taxa de transpiração (Prado, 2023).

2.6.4. Ferramentas digitais para geração de imagens na região infravermelha do espectro

A região de radiação IV do espectro eletromagnético compreende uma faixa localizada entre o VIS e micro-ondas, com comprimentos de onda que variam de 0,7-100 μ m. Todavia, a faixa do IVP (0,7-3,0 μ m), denomina-se como sendo particularmente útil para a análise não invasiva *in situ* de metabolitos primários associado diretamente ao crescimento vegetal, por diversas razões:

- (i) esse tipo de radiação não é absorvido pelos pigmentos foliares;
- (ii) a grande maioria dos metabolitos presentes nas folhas absorve a radiação IV em faixas específicas;
- (iii) a radiação IV penetra a maiores profundidades no tecido vegetal, em comparação à luz visível.

O desenvolvimento de tecnologias para a captura de imagens e dados em faixas específicas do espectro infravermelho tem impulsionado a sua utilização para a avaliação do estado metabólico e, conseqüentemente, do desempenho das plantas sob as mais variadas condições. Por conseguinte, é possível a determinação do conteúdo de uma infinidade de compostos do metabolismo celular, tais como os açúcares solúveis e poliméricos, compostos orgânicos nitrogenados, incluindo proteínas e aminoácidos, biomassa, água, vitaminas e nutrientes minerais. Um exemplo prático é, que é possível nesta região do espectro, acompanhar a perda de água pelas folhas.

Contudo, o desenvolvimento de equipamentos com estas capacidades é limitado devido ao seu elevado custo e à dificuldade de conseguir adquirir uma fonte de luz adequada. (Muazen, 2020 citado em Prado, 2023).

3. Material e Métodos

Com o objetivo de analisar a eficácia dos bioestimulantes microbianos na tolerância ao déficit hídrico, o ensaio experimental foi dividido em duas fases. Na fase I, foi efetuado um *Screening* (triagem) de diferentes bactérias com efeito bioestimulante, em vasos de 1 L, sujeitas ao déficit hídrico num período reduzido (20 dias), no qual procedeu-se à medição das suas respetivas biomassas finais, com o intuito de selecionar três das bactérias (três bioestimulantes microbianos) que contribuíssem para uma maior tolerância ao déficit hídrico. Na fase II, prosseguiu-se com estes três bioestimulantes para um ensaio com vasos de 15 L num período superior à fase anterior, com uma duração de 45 dias. Nesta última fase, foi possível aprofundar o conhecimento das respostas morfológicas e fisiológicas de cada planta, à aplicação dos bioestimulantes perante a indução do stress hídrico.

Neste capítulo são apresentados os métodos que foram utilizados ao longo de todo o trabalho experimental, respetivos a cada fase do ensaio experimental.

3.1. Caracterização do local experimental

O ensaio experimental, realizado em condições controladas foi desenvolvido na estação experimental “Kiplant Lighthouse” (**figura 1**), inserida na empresa Asfertglobal, lda., situada em Santarém - uma empresa que se dedica, essencialmente, ao desenvolvimento de biofertilizantes, bioestimulantes e soluções de biocontrolo com base no uso de microrganismos e de novas moléculas orgânicas originárias de fontes naturais.

A estação experimental contempla a possibilidade de um arejamento pela zenital regulado pelos sensores presentes no interior da estufa, uma monitorização diária da temperatura e humidade mínima, máxima e média. Para além disso, a estação possui onze bancadas com uma dimensão de 3750 mm x 1800 mm, nas quais há a possibilidade de introduzir diferentes dotações de rega.

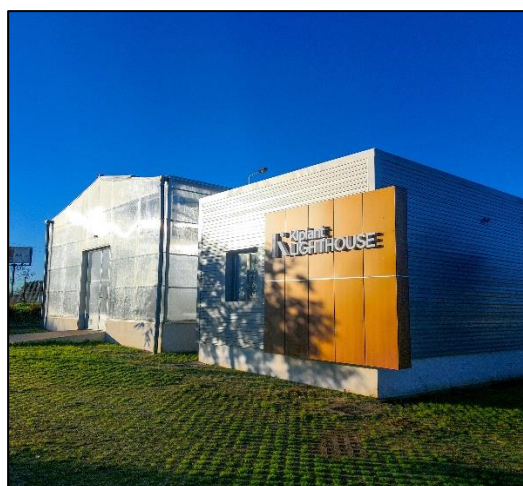



Figura 1 – Estação Experimental “Kiplant Lighthouse”, sediada na empresa Asfertglobal, lda.

3.2. Material Vegetal

Para ambas as fases, foi utilizada uma variedade de ciclo médio (FAO 500) designada por P0937, da firma Pioneer (**Quadro 1**). Uma variedade reconhecida, essencialmente, pela sua precocidade e pelo seu potencial produtivo.

Quadro 1 – Características da variedade P 0937 (Fonte: Pioneer)

Características	Variedade P0937
• Excelente potencial produtivo;	
• Regularidade de produção;	
• Tolerância ao <i>Helminthosporium</i> ;	
• Grão dentado de bom peso específico;	
• Espiga cilíndrica, de grande diâmetro e com tendência a fecundar até à ponta;	
• Brácteas abertas que permitem uma secagem rápida do grão;	
• Híbrido de porte médio-baixo com inserção baixa da espiga.	

3.3. FASE I – Análise preliminar através de um *screening* de bactérias

3.3.1. Delineamento experimental

Nesta fase, procedeu-se à análise de dez espécies distintas de bactérias com efeito bioestimulante – originados através de estirpes isoladas pela Bioscale, lda. (empresa pertencente ao grupo Asfertglobal, lda).

O dispositivo experimental foi realizado com base na casualização total, como tal, os vasos foram dispostos aleatoriamente. Assim, foi possível estudar de que forma a aplicação de bioestimulantes proporcionava uma maior resistência ao défice de água. Assim, foram induzidos dois tipos de regime hídrico: um sem restrições hídricas (SRH), e o outro com restrições hídricas (CRH).

No **Quadro 2**, apresentam-se os principais parâmetros do delineamento experimental e na **figura 2** o respetivo esquema experimental.

Quadro 2 - Descrição dos principais parâmetros do delineamento experimental.

Parâmetros	Descrição
Dispositivo Experimental	Vasos totalmente randomizados
Tratamentos	<ol style="list-style-type: none">1. Controlo2. Bio 1 – <i>Bacillus</i> sp. 13. Bio 2 – <i>Bacillus</i> sp. 24. Bio 3 – <i>Bacillus</i> sp. 35. Bio 4 – <i>Pseudomonas</i> sp. 16. Bio 5 – <i>Pseudomonas</i> sp. 27. Bio 6 – <i>Pseudomonas</i> sp. 38. Bio 7 – <i>Pseudomonas</i> sp. 49. Bio 8 – <i>Pseudomonas</i> sp. 510. Bio 9 – <i>Azospirillum</i> sp. 111. Bio 10 – <i>Streptomyces</i> sp. 1
Dimensão do ensaio experimental	11 Tratamentos x 2 Regimes Hídricos x 6 repetições = 132 Plantas em vaso
Variável Observada	Biomassa final

Ø +	Bio 6 -	Bio 8 -	Bio 1 -	Bio 3 +	Bio 5 -	Bio 10 -	Bio 9 -	Bio 2 -	Bio 7 -	Bio 4 -
Bio 3 -	Bio 8 +	Bio 4 +	Ø -	Bio 6 +	Bio 7 +	Bio 1 +	Bio 5 +	Bio 9 +	Bio 10 +	Bio 2 +
Bio 7 -	Bio 9 -	Bio 5 -	Bio 2 -	Bio 1 -	Bio 8 -	Bio 4 -	Bio 6 -	Ø -	Bio 3 -	Bio 10 -
Bio 10 +	Bio 5 +	Bio 3 +	Bio 9 +	Bio 4 +	Ø +	Bio 2 +	Bio 7 +	Bio 8 +	Bio 1 +	Bio 6 +
Bio 2 -	Bio 4 -	Bio 6 -	Bio 7 -	Bio 9 -	Bio 10 -	Bio 3 -	Bio 1 -	Bio 5 -	Ø +	Bio 8 -
Bio 1 +	Bio 3 +	Ø -	Bio 10 +	Bio 2 +	Bio 4 +	Bio 9 +	Bio 8 +	Bio 6 -	Bio 5 +	Bio 7 +
Bio 10 -	Bio 1 +	Bio 6 +	Bio 3 +	Bio 4 +	Bio 9 -	Ø +	Bio 8	Bio 7 -	Bio 2 -	Bio 5 -
Bio 7 +	Ø -	Bio 4 -	Bio 2 +	Bio 6 -	Bio 8	Bio 5 +	Bio 9 +	Bio 10 +	Bio 1 -	Bio 3 -
Bio 5 -	Bio 2 -	Bio 7 +	Bio 8	Bio 9 -	Bio 10 -	Bio 4 +	Bio 3 +	Bio 1 +	Bio 6 +	Ø +
Bio 1 -	Bio 3 -	Bio 5 +	Bio 6 -	Ø -	Bio 7 -	Bio 10 +	Bio 2 +	Bio 8	Bio 4 -	Bio 9 +
Bio 6 +	Bio 4 +	Ø +	Bio 10 -	Bio 8	Bio 5 -	Bio 9 -	Bio 7 +	Bio 2 -	Bio 3 +	Bio 1 +
Bio 2 +	Bio 9 +	Bio 8	Bio 5 +	Bio 3 -	Bio 4 -	Bio 1 -	Ø -	Bio 6 -	Bio 7 -	Bio 10 +

Figura 2 – Esquema Experimental. (+ : Sem Restrição Hídrica; - : Com Restrição Hídrica; Ø: Controlo; **Bio 1 a 10**: diferentes bioestimulantes)

O desenho experimental incluiu um fator (tratamento) constituído por dez tratamentos (dez bioestimulantes, além do Controlo), um fator (regime hídrico) com dois níveis devido ao estudo comparativo entre os dois tipos de regime hídrico: com e sem restrições hídricas (CRH e SRH, respetivamente). A cada regime, e a cada tratamento, fez-se seis repetições que estiveram colocadas em locais diferentes e completamente aleatórios (**figura 3**).



Figura 3 – Instalação do esquema experimental nas bancadas da estufa.

Esta fase experimental, decorreu entre 25 de maio de 2023 e 14 de junho de 2023, até ao estágio vegetativo V4, aos 20 dias após a sementeira (DAS).

Para proceder à seleção dos tratamentos que melhor induziam a tolerância ao défice hídrico, procedeu-se ao critério da avaliação da biomassa final da planta.

3.3.2. Registos climáticos

Ao longo do tempo experimental, procedeu-se ao registo diário da temperatura exterior através da estação meteorológica presente na Estação Experimental, e da temperatura interior e humidade relativa medida através do sensor (**figura 4**) presente no interior.



Figura 4 - Sensor utilizado para a medição da temperatura e da humidade interior da estufa, ao longo do ensaio.

3.3.3. Implementação do ensaio

O ensaio na estação “Kiplant Lighthouse” iniciou-se pela secagem do solo, pelo facto se ser necessário garantir que cada um dos vasos de 1 L teriam exatamente o mesmo peso. Para tal, com o recurso de uma balança, pesou-se 1 kg de solo para cada um dos vasos previamente limpos. Posteriormente, para ser possível implementar as condições de défice hídrico, determinou-se o volume de água presente no vaso com o substrato à capacidade de campo (VCC) a partir da seguinte expressão:

$$CC (H_2O) (g) = \frac{m_{total} - m_{seco}}{\rho_{água}}$$

$CC_{H_2O} (g)$ – Quantidade de água presente no vaso à Capacidade de Campo (g);

m_{total} – massa total do vaso à Capacidade de Campo;

m_{seco} – massa do vaso com o substrato seco;

$\rho_{\text{água}}$ – densidade da água (1 kg/dm³).

Para controlar a quantidade de água a fornecer para cada vaso, determinou-se o peso do vaso com solo à capacidade de campo.

Inicialmente foi determinado o peso do vaso com o solo seco, pesando o solo de 3 vasos, e calculando a média (m_{seco}). De seguida, para a determinação da capacidade de campo, os vasos foram regados em excesso e foi esperado que a drenagem cessasse. De seguida, pesaram-se os vasos e, mais uma vez, determinou-se a média (m_{total}).

Subtraiu-se m_{total} de m_{seco} e determinou-se o volume de água presente no vaso à capacidade de campo (V_{CC}).

$$m_{\text{total}} = \text{Peso do vaso} + \text{Peso do Solo (100\% CC)} = 1\,062,50 \text{ g}$$

$$m_{\text{seco}} = \text{Peso do vaso} + \text{Peso do Solo Seco} = 956,70 \text{ g}$$

$$V_{\text{CC}} = 1062,50 - 956,70 = 105,80 \text{ g H}_2\text{O}$$

Com base nesta informação, foi possível determinar a quantidade de água a fornecer para:

- **Condições de défice hídrico:** 40% CC = 42,32 g (H₂O) + 956,70 g (m_{seco}) = 999,02 g (utilizou-se 1000 g)
- **Condições de conforto hídrico:** 80% CC = 84,64 g (H₂O) + 956,70 g (m_{seco}) = 1 041,34 g (utilizou-se 1 100 g)

Logo de início, os tratamentos em conforto hídrico foram regados até o peso de cada vaso atingir as 1 100 g, correspondendo a 80% do volume de água à capacidade de campo. Nos tratamentos de défice hídrico, o peso de cada vaso foi ajustado a 1000 g, correspondendo a 40% do volume de água à capacidade de campo. Contudo, estes valores foram reajustados em função do estado fenológico e/ou das condições meteorológicas.

O solo, segundo o respetivo boletim de análise (**Anexo 1**), apresentava uma textura grosseira (franco arenosa), pH ligeiramente alcalino (7,2) e alta concentração de matéria orgânica (3,43%). Em termos de nutrientes extraíveis continha concentrações baixas de Azoto Total e muito altas de fósforo e potássio.



Figura 5 - Fotografia dos vasos Sem Restrições Hídricas (Lado Esquerdo) e Com Restrições Hídricas (Lado Direito).

Nos tratamentos sem restrição hídrica, a água perdida por transpiração foi manualmente repostada na totalidade, mantendo assim o teor de humidade próximo da capacidade de campo. Nos tratamentos com restrição hídrica, foi repostada a quantidade de água necessária para manter o teor de humidade num valor correspondente ao aparecimento de sinais de stress nas plantas, havendo um ajustamento da quantidade de água sempre que necessário.

3.3.4. Aplicação de bioestimulantes

Os bioestimulantes testados, derivaram da coleção da empresa Asfertglobal, correspondendo a diferentes formulações contendo rizobactérias promotoras do crescimento da planta e com o potencial de conferir efeitos de resistência a stresses abióticos.

Tal como referido anteriormente, foram testados dez bioestimulantes, cada um compreendendo uma estirpe bacteriana diferente, sendo que as estirpes bacterianas pertenciam a géneros distintos (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces* e *Azospirillum*), com os seus respetivos códigos mencionados no Quadro 2. Os tratamentos foram aplicados por rega manual, aos 3 DAS e aos 9 DAS.

A dose de aplicação de cada inóculo foi de 0,5 mL/planta com uma concentração de 10^8 de ufc (unidades formadoras de colónias), numa calda de água de 20 mL/planta. Como Controlo (sem aplicação de bioestimulante), foi aplicado apenas 20 mL de água.

3.3.5. Variável observada

3.3.5.1. Biomassa final

Perante os dez bioestimulantes em estudo, tal como referido anteriormente, o objetivo focava-se em conseguir analisar e selecionar os três tratamentos que induziam uma maior tolerância ao défice hídrico. Tendo em conta que a Fase I, consistia num *Screening* de Bactérias e por ser num período tão curto, procedeu-se unicamente à medição da biomassa final de cada planta.

Assim, aos 20 DAS, foi efetuado o corte da parte aérea de cada uma das 6 plantas de cada tratamento e respetivo regime hídrico. Posteriormente, as plantas foram transportadas para o laboratório de apoio à estufa onde se procedeu à determinação do peso fresco, unicamente, da parte aérea de cada planta. De seguida, o material vegetal foi colocado numa estufa ventilada, à temperatura de 65 °C durante 3 dias, até o peso se manter estável, determinando-se o peso seco numa balança de precisão, até às centésimas da grama.

3.3.6. Análise estatística

Os resultados obtidos, foram analisados estatisticamente por Análise de Variâncias de dois fatores (Two-way, ANOVA) e, de seguida, para verificação das diferenças entre médias dos tratamentos por regime hídrico, utilizou-se o teste à posteriori de “Duncan”, usando-se um nível de significância (p) de 0,05.

A análise estatística foi realizada no programa IBM SPSS (versão 27).

3.4. Fase II – Estudo comparativo de três bioestimulantes que induzem uma maior tolerância ao défice hídrico

3.4.1. Delineamento experimental

Nesta fase, pretendeu-se aprofundar o conhecimento das três estirpes de bactérias (bioestimulantes) que induziram uma maior tolerância ao défice hídrico no ensaio da fase I, através do acompanhamento da fenotipagem digital de alto rendimento que permitiu analisar ao longo do tempo parâmetros morfológicos e fisiológicos sobre as plantas em estudo. No final do ensaio, efetuaram-se também medições de diversos parâmetros, como fluorescência modulada da clorofila *a*, pesos frescos da parte radicular e da parte aérea, as respetivas

biomassas (pesos secos), diâmetro do caule, índice da razão entre o peso da parte radicular e o peso da parte aérea, e conteúdo de água presente nas folhas.

O delineamento foi realizado com base num desenho experimental de “Split Plot”, em que o fator do regime hídrico foi considerado como “Main Plot”, que contém os dois diferentes regimes (sem restrições hídricas e com restrições hídricas). Dentro de cada “Main Plot”, estão compreendidos os quatro tratamentos (Controlo e os três bioestimulantes) que correspondem aos “Subplots”. Cada “Main Plot” foi replicado quatro vezes e cada tratamento dentro de um “Subplot” é constituído por duas subréplicas (dois vasos).

No **quadro 3** apresentam-se os principais parâmetros do delineamento experimental e na **figura 5** o esquema experimental.

Quadro 3 - Descrição dos principais parâmetros do delineamento experimental.

Parâmetros	Descrição
Número de Blocos	4
Dispositivo Experimental	Ensaio com base num <i>Split Plot</i> (Parcelas Subdivididas).
Tratamentos	<ol style="list-style-type: none"> 1. Controlo 2. Bio 2 – <i>Bacillus</i> sp. 3. Bio 5 – <i>Pseudomonas</i> sp. 4. Bio 10 – <i>Streptomyces</i> sp.
Dimensão do ensaio experimental	4 Tratamentos x 2 Regimes Hídricos x 8 repetições (4 unidades experimentais correspondendo a 4 x 2 plantas) = 64 Plantas em vaso
Variáveis observadas	<p>No decorrer do ensaio:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Área Foliar 2. Altura da planta 3. NPCI (<i>Normalized Pigment Chlorophyll Index</i>) 4. NDVI (<i>Normalized Difference Vegetation Index</i>) 5. GLI (<i>Green Leaf Index</i>) <p>Medidas Finais:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Fv/Fm (Fluorescência modulada da clorofila <i>a</i>) 2. Diâmetro do Caule 3. Peso Fresco da parte radicular e da parte aérea 4. Biomassa radicular e da parte aérea 5. Análises ao Material Vegetal

Bloco 1		SRH				CRH			
	1	Controlo	Bio 2	Bio 10	Bio 5	Bio 10	Controlo	Bio 5	Bio 2
	2	Controlo	Bio 2	Bio 10	Bio 5	Bio 10	Controlo	Bio 5	Bio 2
Bloco 2		CRH				SRH			
	1	Bio 10	Bio 5	Controlo	Bio 2	Bio 5	Bio 2	Controlo	Bio 10
	2	Bio 10	Bio 5	Controlo	Bio 2	Bio 5	Bio 2	Controlo	Bio 10
Bloco 3		SRH				CRH			
	1	Bio 2	Controlo	Bio 5	Bio 10	Controlo	Bio 10	Bio 2	Bio 5
	2	Bio 2	Controlo	Bio 5	Bio 10	Controlo	Bio 10	Bio 2	Bio 5
Bloco 4		CRH				SRH			
	1	Bio 5	Bio 10	Bio 2	Controlo	Bio 2	Bio 5	Bio 10	Controlo
	2	Bio 5	Bio 10	Bio 2	Controlo	Bio 2	Bio 5	Bio 10	Controlo

Figura 6 - Esquema Experimental.

Esta fase experimental, decorreu entre 1 de setembro de 2023 e 16 de outubro de 2023, até ao estágio vegetativo V9 (45 DAS).

3.4.2. Registos climáticos

Os registos climáticos foram registados segundo o descrito em 3.3.2..

3.4.3. Implementação do ensaio

A quantidade de água a fornecer para os dois regimes hídricos em estudo, com e sem restrições hídricas (CRH e SRH), foi determinada através do mesmo método enunciado em 3.3.3.. Contudo, nesta fase, a rega já não foi efetuada manualmente, mas sim, através do sistema de rega gota-a-gota instalado para cada bancada tendo-se adaptado os cálculos para determinar os débitos de rega a aplicar no decorrer do ensaio.

A quantidade de água a fornecer para os dois regimes hídricos em estudo, CRH e SRH, foi determinada através do mesmo método enunciado em 3.3.3.:

- **Condições de défice hídrico:** 40% CC = 555,45 g (H₂O) + 15 352,00 g (m_{seco}) = 15 907,45 g (utilizou-se 15 000 g)
- **Condições de conforto hídrico:** 80% CC = 1 269,45 g (H₂O) + 15 352,00 g (m_{seco}) = 16 621,45 g (utilizou-se 17 000 g)

Logo de início, os tratamentos sem restrições hídricas foram regados até o peso de cada vaso atingir as 17 000 g, correspondendo a 80% do volume de água à capacidade de campo. Nos tratamentos de défice hídrico, o peso de cada vaso foi ajustado a 15 000 g, correspondendo a 40% do volume de água à capacidade de campo.

Contudo, nesta fase, a rega já não foi efetuada manualmente no decorrer do ensaio, mas sim, através do sistema de rega gota-a-gota instalado para cada bancada tendo-se determinado que para **condições de défice hídrico**, a dotação de rega seria de 300 mL/ dia e para **condições de conforto hídrico**, a dotação de rega seria de 600 mL/ dia. Estes valores foram reajustados em função do estado fenológico e/ou das condições meteorológicas.

De forma a replicar as condições de ensaio, usou-se o mesmo solo da fase I.

3.4.4. Aplicação de bioestimulantes

Tal como referido anteriormente, nesta fase, avaliou-se a eficácia de três bioestimulantes compreendendo cada um uma estirpe de bactéria pertencente a diferentes géneros (*Bacillus*, *Pseudomonas* e *Streptomyces*) com os seus respetivos códigos,

mencionados no **quadro 3**, tendo sido aplicados por rega manual. Os bioestimulantes foram aplicados aos 15 DAS e aos 22 DAS.

A dose de aplicação de cada inóculo foi de 0,5mL/planta com uma concentração de 10^8 de cfu, numa calda de 100 mL/planta. Como Controlo, foram aplicados 100 mL de água desionizada.

3.4.5. Observações e registos

3.4.5.1. Fenotipagem digital

Neste ensaio, foi avaliada a evolução do crescimento das plantas, através de um sistema automatizado de fenotipagem de plantas denominado por *TraitFinder* (Phenospex, Heerlen, Holanda) que serviu para registar informação da refletância multiespectral de alta resolução sobre as plantas em estudo, enquanto foi capturando a estrutura tridimensional da vegetação (**figura 7**). Denomina-se assim, como “fenotipagem digital de alto rendimento”. Este tipo de equipamento, permite obter uma grande fonte de dados de características quantitativas em ensaios de estudo, além de fornecer dados multifacetados, possibilitando a redução da carga de trabalho em comparação com as medições de características clássicas.

Este equipamento permite analisar certas características das plantas em segundos, através do sensor *PlantEye* (**figura 7**). Todos os perfis de altura 2D capturados, através do movimento do scanner sobre as plantas, acionado por um motor elétrico num eixo linear, são agrupados para gerar uma nuvem de pontos 3D. Cada ponto de dados contém informações sobre a posição 3D no sistema de coordenadas (X, Y e Z), bem como a refletância dos comprimentos de onda vermelho, verde, azul e *near-infrared* (vermelho = 620-645 nm, verde = 530- 540 nm, azul = 460-485 nm, *near-infrared* = 820-850 nm). Por fim, estas nuvens de pontos são processadas através do software integrado *HortControl* (Phenospex, Heerlen, Holanda) que fornece parâmetros de desenvolvimento e fisiológicos (**quadro 4**).



Figura 7 – Equipamento *TraitFinder* (esquerda), Sensores *PlantEye* (direita).

Quadro 4 - Parâmetros da Fenotipagem Digital, calculados pelo *Software HortControl*, estudados e utilizados no decorrer do ensaio experimental. (Fonte: <https://phenospex.helpdocs.com/plant-parameters/planteye-parameters>)

Parâmetro	Descrição	Valor inferior	Valor Superior	Limite Potencial	Referências
Área Foliar (mm²)	Consiste na área foliar por unidade do tamanho do setor (Área da folha/tamanho do setor)	Conjunto de baixa complexidade estrutural	Conjunto de alta complexidade estrutural	0 - ∞	Fang <i>et al.</i> (2019); Knops and Reinhart (2000)
Altura Máxima (mm)	Consiste na medição desde o solo até ao ponto mais alto da planta.	Altura (máxima) mais baixa da planta.	Altura (máxima) mais alta da planta.	0 - ∞	Falster and Westoby (2003); Quétier <i>et al.</i> (2007; Moles <i>et al.</i> (2009))
NDVI (Normalized Digital Vegetation Index) (sem unidade)	Consiste na relação entre a luz vermelha refletida e o near-infrared; $(NIR - RED) / (NIR + RED)$	-1 - 0 = plantas mortas ou objetos não-vegetais; 0,1 - 0,2 = solo descoberto; 0,2 - 0,5 = Vegetação dispersa e/ou pouco saudável; > 0,5 = Vegetação densa e/ou saudável.		-1 - 1	Myneni and Williams (1994); Senay and Elliot (2000); Thenkabail <i>et al.</i> (2000); Kaur <i>et al.</i> (2015)

NPCI <i>(Normalized Pigments Chlorophyll ratio Index)</i> (sem unidade)	Consiste na razão entre o comprimento de onda verde e azul; $(RED - BLUE) / (RED + BLUE)$	Baixa refletância do vermelho $\hat{=}$ maior o conteúdo de clorofila (0,10 - 0,25 = vegetação verde).	Alta refletância do vermelho $\hat{=}$ menor o conteúdo de clorofila (>0.25 = vegetação em stress).	-1 – 1	Peñuelas <i>et al.</i> (1994); Bannari <i>et al.</i> (2007)
GLI (Green leaf Index) (sem unidade)	Demonstra a relação entre a refletância da onda do verde para com a onda do vermelho e do azul; $(2 * G - R - B) / (R + G + B)$	Mais vegetação verde.	Menos vegetação verde.	-1 – 1	Keenan <i>et al.</i> (2014)

Procedeu-se ao início do uso deste equipamento, quando as plantas já se encontravam no estágio V4 (com 4 folhas). No decorrer do ensaio experimental, foram efetuadas seis leituras para cada bloco experimental: ao 15°, ao 20°, ao 28°, ao 32°, ao 38°, e ao 45° DAS.

3.4.5.2. Medição da fluorescência da clorofila *a*

Este método é reconhecido como uma medição não-invasiva da atividade do fotossistema II (PSII), assim como, sendo uma técnica bastante útil nas áreas de investigação da Fisiologia Vegetal e Ecofisiologia. A sensibilidade da atividade do PSII a fatores abióticos e bióticos tornou esta técnica fundamental, não só para a possível compreensão dos mecanismos fotossintéticos, mas também como um indicador mais amplo de como as plantas respondem às alterações ambientais.

Através da medição da fluorescência da clorofila *a*, é possível recolher informações acerca da eficiência dos processos fotoquímicos e não fotoquímicos. Quando se aplica um pulso saturante de luz actínica, os centros de reação ficam momentaneamente fechados e, uma vez que os processos de dissipação de energia são competitivos, tem-se um rendimento máximo da fluorescência (F_m). A expressão $(F_m - F_o) / F_m$, normalmente referida como F_v / F_m , representa a eficiência máxima da conversão de energia pelos centros de reação abertos do PSII. Este valor é altamente conservado, sendo cerca de 0,8 em plantas não sujeitas a stresse (Maxwell e Johnson, 2000; Hunt, 2003). Uma redução desde valor, indica que o PSII foi

danificado, causado por fatores ambientais ou pela aplicação de inibidores (Maxwell e Johnson, 2000).

Neste trabalho foi utilizado o fluorímetro *Handy PEA+* (**figura 8**). A unidade do sensor possui um conjunto de 3 *LEDs* vermelhos ultrabrilhantes que são filtrados óticamente para um comprimento de onda de pico de 650 nm (valor que é prontamente absorvido pela clorofila) a uma intensidade máxima até de 3.500 $\mu\text{mol m}^{-2}$ na superfície da amostra. Os *LEDs* são focados através de lentes na superfície da folha para fornecer iluminação uniforme sobre a área da folha exposta pelo clipe (4 mm de diâmetro) – Figura 9 - que previamente adaptam as plantas às escuras, durante cerca de 15 minutos. Um circuito de feedback ótico monitoriza e corrige as alterações na intensidade de saída dos *LEDs* que podem ser causadas pelo acúmulo de calor interno nos mesmos. O circuito também compensa as alterações de intensidade causadas pela variação da temperatura ambiente (*Hansatech Instruments, lda*).



Figura 8 – Fluorímetro Handy PEA+ (lado esquerdo); Clipes por onde é efetuado o pulso de luz sobre a área da folha exposta.

3.4.5.3. Diâmetro do caule

No dia 15 de outubro (44 DAS) efetuou-se, como uma das medidas finais, o diâmetro do caule de cada planta com recurso a um paquímetro de inox digital (**figura 9**) obtendo os valores expressos em mm.



Figura 9 - Paquímetro digital usado para a medição final do diâmetro dos caules.

3.4.5.4. Peso fresco e biomassa: da parte radicular e da parte aérea

À semelhança da Fase I, no final do ensaio, efetuou-se o corte das 8 plantas de cada tratamento, e respetivo regime hídrico. Posteriormente, as plantas foram transportadas para o laboratório de apoio à estufa e procedeu-se a determinação do peso fresco da parte aérea (**figura 10**), assim como a lavagem e pesagem da parte radicular de cada planta. Por fim, o material vegetal foi colocado numa estufa ventilada, à temperatura de 65 °C, determinando-se o peso seco numa balança de precisão, até às centésimas da grama.

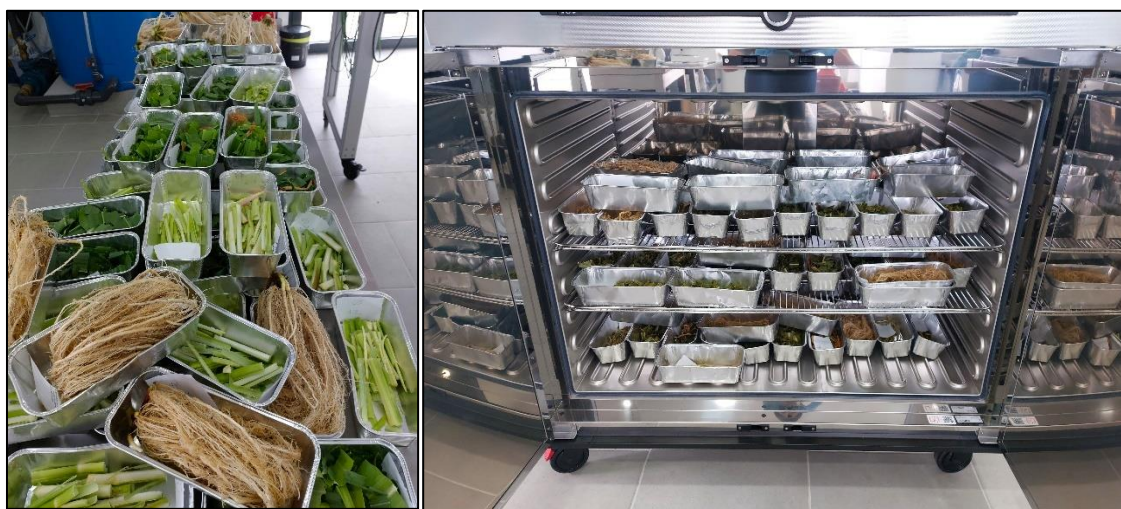


Figura 10 – Realização do Peso Fresco da Parte Radicular e da Parte Aérea (lado esquerdo), e colocação do material vegetal numa estufa ventilada para proceder-se à medição da biomassa (Lado direito).

3.4.5.5. Análise ao material vegetal

Na etapa final, foram recolhidas 8 amostras compostas, selecionadas aleatoriamente a partir do material vegetal das 8 réplicas de cada tratamento. Posteriormente, essas amostras foram submetidas a análises no laboratório da ESAS (Escola Superior Agrária de Santarém)

para caracterização dos efeitos nutricionais durante a aplicação de diferentes bioestimulantes, tanto em condições de déficit hídrico quanto em condições ideais.

3.4.6. Análise estatística

Os resultados obtidos através da fenotipagem digital, foram analisados estatisticamente por uma Análise de Variância de medições repetidas (repeated measurements ANOVA) compreendendo os fatores: tempo, regime hídrico e os tratamentos aplicados. De seguida, para cada amostragem temporal e por regime hídrico, efetuou-se o teste à posteriori de “Duncan” para verificação de diferenças entre médias, usando um nível de significância (p) de 0,05.

Relativamente, aos restantes parâmetros – Diâmetro do caule e pesos das plantas – os resultados obtidos foram analisados estatisticamente por uma Análise de Variância (ANOVA) com os fatores regime hídrico e tratamentos aplicados. De seguida, para verificação das diferenças entre médias por regime hídrico, utilizou-se o teste à posteriori de “Duncan”, usando-se um nível de significância (p) de 0,05.

A análise estatística foi realizada no programa IBM SPSS (versão 27).

4. Resultados e Discussão

4.1. FASE I – Análise preliminar através de um *screening* de bactérias

O ensaio realizado durante a primeira fase do trabalho permitiu a seleção de três bioestimulantes microbianos, que se distinguiram graças à resposta positiva que induziram nas plantas sob a indução do défice hídrico.

4.1.1. Registo diário da temperatura e da humidade no interior da estufa

Esta fase, decorreu no final da Primavera, tendo sido possível registar os dados climáticos decorrer do ensaio através da estação meteorológica e a sua ligação com os sensores, presentes nas instalações da estufa, que procedem às medições da temperatura e da humidade, diariamente. Na **figura 11** é possível observar a evolução da temperatura máxima, da temperatura mínima e a humidade relativa presente no interior da estufa, dias após a sementeira. Os valores registados estão disponibilizados no Anexo II.

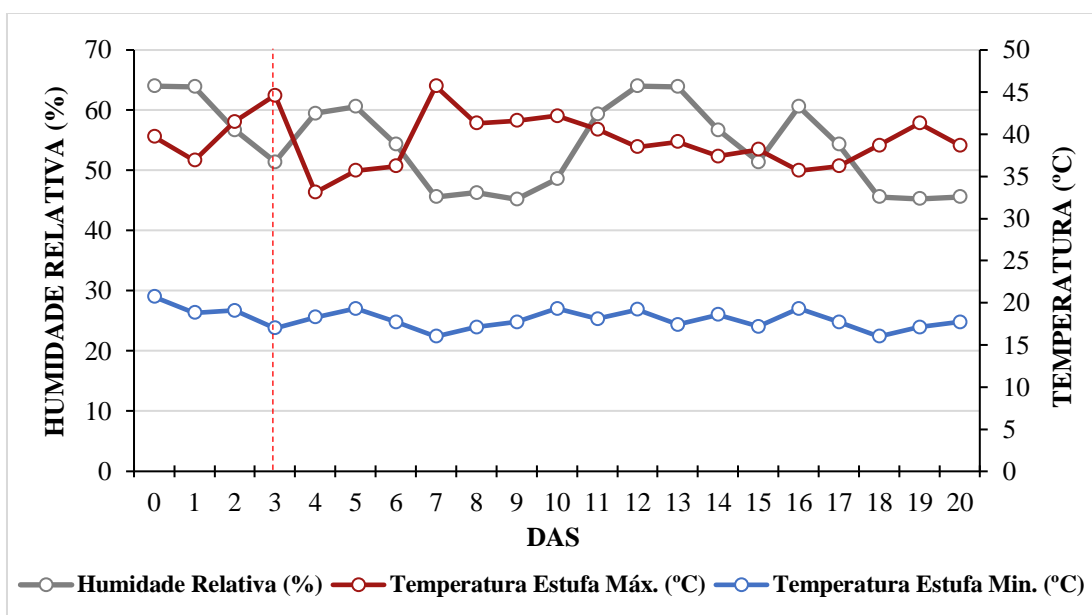


Figura 11 - Dados climáticos referentes ao período de realização da fase I, do ensaio experimental. O tracejado vermelho indica o início da indução do défice hídrico.

Para as plantas em vaso que sofreram restrições hídricas, iniciou-se a indução do défice hídrico aos 3 DAS, para que não houvesse falhas de germinação, permitindo que todas as plantas se encontrassem nas mesmas condições.

Através da análise do gráfico, percebe-se que o ensaio decorreu em condições de temperaturas máximas a rondar valores entre 33°C e 45,7°C, e em condições de humidade a rondar valores entre 45% e 64%.

4.1.2. Efeitos do défice hídrico

4.1.2.1. Peso fresco da parte aérea

Na **figura 12**, estão evidenciados os resultados obtidos do Peso Fresco das plantas de milho, por tratamento. Estes resultados permitem inferir quais foram os efeitos causados sob a aplicação dos bioestimulantes microbianos perante as duas modalidades: sem restrições hídricas (SRH) e com restrições hídricas (CRH).

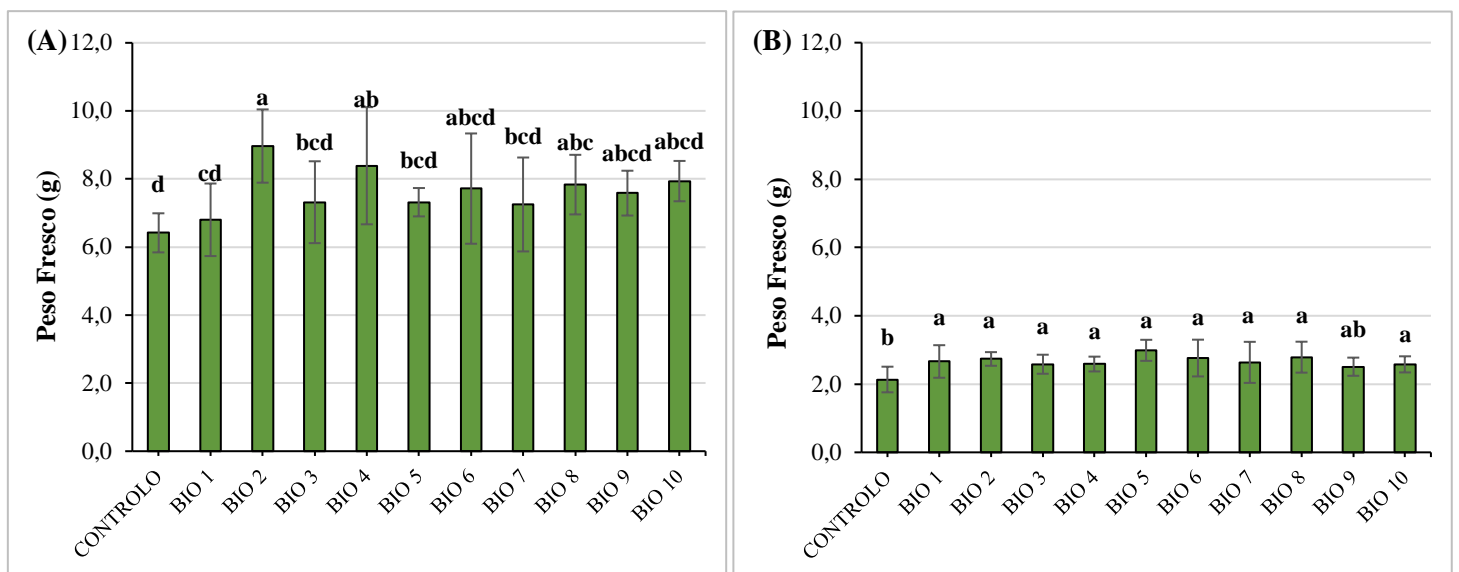


Figura 12 - Efeito do défice hídrico no peso fresco da parte aérea das plantas de milho, por tratamento. As barras representam a média das plantas \pm Desvio Padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$). (A): Plantas SRH; (B): Plantas CRH.

Através da interpretação dos gráficos, é possível entender que:

Em ambas as modalidades, encontraram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) no crescimento das plantas de milho entre tratamentos com a aplicação dos bioestimulantes e as plantas Controlo, sendo este padrão mais evidente na modalidade CRH. A redução do débito hídrico, influenciou negativamente o desenvolvimento das plantas (**figura 12 - A e B**).

(A): as plantas tratadas com os bioestimulantes 2, 4 e 8 apresentaram um peso fresco significativamente superior ao Controlo.

(B): no regime CRH, com exceção do tratamento Bio 9, todas as plantas inoculadas com bioestimulantes tiveram um crescimento significativamente superior ao Controlo.

4.1.2.2. Biomassa final da parte aérea

A **figura 13** (A e B) apresenta os resultados obtidos, relativamente, à biomassa (peso seco) das plantas de milho, por tratamento e por regime hídrico.

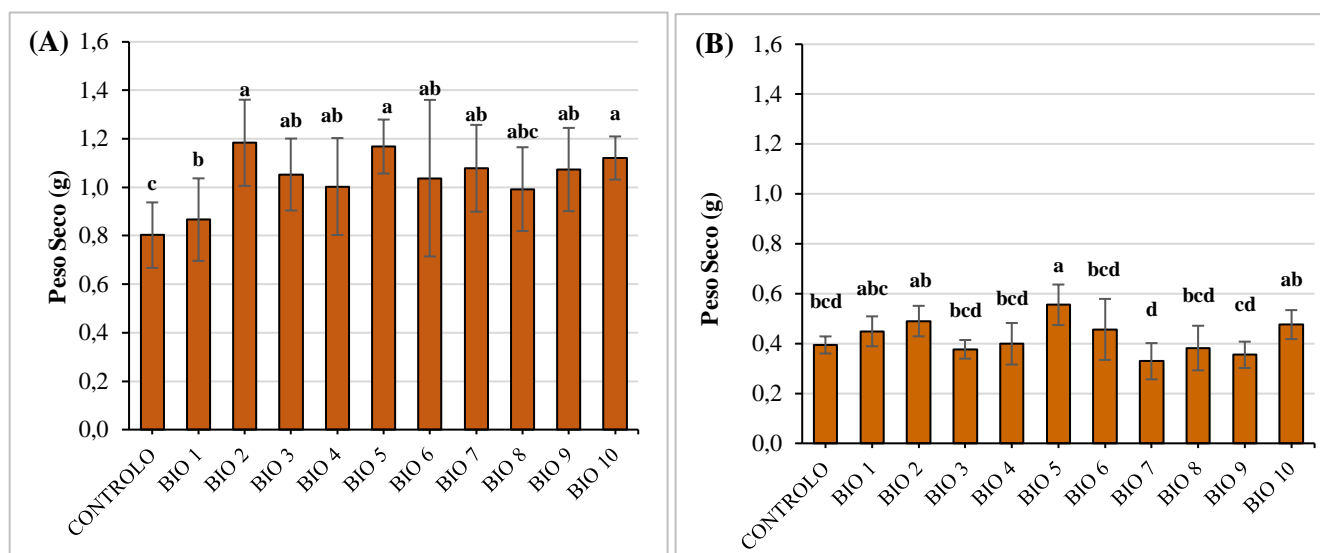


Figura 13 - Efeito dos diferentes tratamentos, SRH e CRH, na biomassa final das plantas de milho. As barras representam a média das plantas \pm Desvio Padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$). (A): Plantas SRH; (B): Plantas CRH.

A biomassa na modalidade CRH, foi inferior à biomassa das plantas da modalidade SRH, ficando evidente o efeito do stress hídrico causado através da redução do débito. Em ambas as modalidades, encontraram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) no crescimento das plantas de milho entre tratamentos com a aplicação dos bioestimulantes e as plantas Controlo.

(A): no regime SRH, com exceção do tratamento Bio 8, todas as plantas inoculadas com bioestimulantes apresentaram uma biomassa significativamente superior ($p < 0,05$) ao Controlo. Para mais, entre os bioestimulantes, os tratamentos Bio 2, Bio 5 e Bio 10 apresentaram tendências de maiores biomassas para com os restantes tratamentos de bioestimulantes (só estatisticamente superior ao tratamento Bio 1).

(B): no regime CRH, apenas as plantas inoculadas com o tratamento Bio 5 tiveram uma biomassa significativamente superior ($p < 0,05$) ao Controlo. Entre os tratamentos de

bioestimulantes, Bio 5 foi significativamente superior ($p < 0,05$) aos restantes com exceção de Bio 2 e Bio 10.

Relativamente à **figura 13 (A)**, está comprovado o efeito dos bioestimulantes quando o objetivo consiste em induzir acréscimos na sua biomassa e consequentemente favorecer a sua produção futura. Assim, na mesma direção de outros trabalhos, comprovou-se que as bactérias promotoras de crescimento, utilizadas como bioestimulantes, são microrganismos multifuncionais que têm uma grande influência no crescimento das plantas (Du Jardin, 2015).

Na **figura 13 (B)**, a situação já não é tão similar: foi possível verificar que, perante uma situação de défice hídrico, nem todos os bioestimulantes possuem a capacidade de estimular o crescimento das plantas comparativamente ao Controlo - como é o caso dos tratamentos Bio 3, Bio 7, Bio 8 e Bio 9 – justificando a complexidade da interação entre plantas, microrganismos e stresses ambientais, e a necessidade contínua de pesquisa para desenvolver bioestimulantes mais eficazes em situações adversas (Cellini *et al.*, 2020).

Analisando os resultados obtidos nas duas modalidades hídricas, verificou-se que a grande redução de disponibilidade hídrica causou um impacto significativo na biomassa final das plantas, tendo diminuído por essa razão. Este comportamento negativo no crescimento das plantas representa uma das principais preocupações na atualidade e muitas pesquisas recentes indicam a necessidade de aplicar novas soluções que mitiguem os efeitos adversos do défice hídrico.

Nas duas modalidades hídricas (CRH e SRH), os tratamentos Bio 2, Bio 5 e Bio 10 destacaram-se na indução de acréscimos de biomassa final nas plantas, quando comparados com as plantas Controlo de cada respetiva modalidade. Este comportamento indica que os bioestimulantes podem melhorar a tolerância das plantas à falta de água, resultando num melhor desempenho de crescimento, tal como evidenciado por Mohamad Hesam Shahrajabian *et al.* (2023).

Como tal, os tratamentos acima mencionados, passaram para a seguinte fase experimental, tendo em conta a importância de haver uma pesquisa contínua e um desenvolvimento de bioestimulantes específicos que possam ser usados como ferramentas para uma agricultura sustentável em ambientes sujeitos ao défice hídrico.

4.2. Fase II – Estudo comparativo aprofundado de três bioestimulantes que induzem uma maior tolerância ao déficit hídrico

4.2.1. Registo diário da temperatura e da humidade no interior da estufa

Tal como descrito em 3.3.2, registaram-se os dados climáticos ao longo da realização do ensaio. Na **figura 14** é possível observar a evolução das temperaturas máximas e as humidades relativas, diariamente após a execução da sementeira. Os valores das temperaturas e das humidades registadas estão disponibilizados no Anexo III.

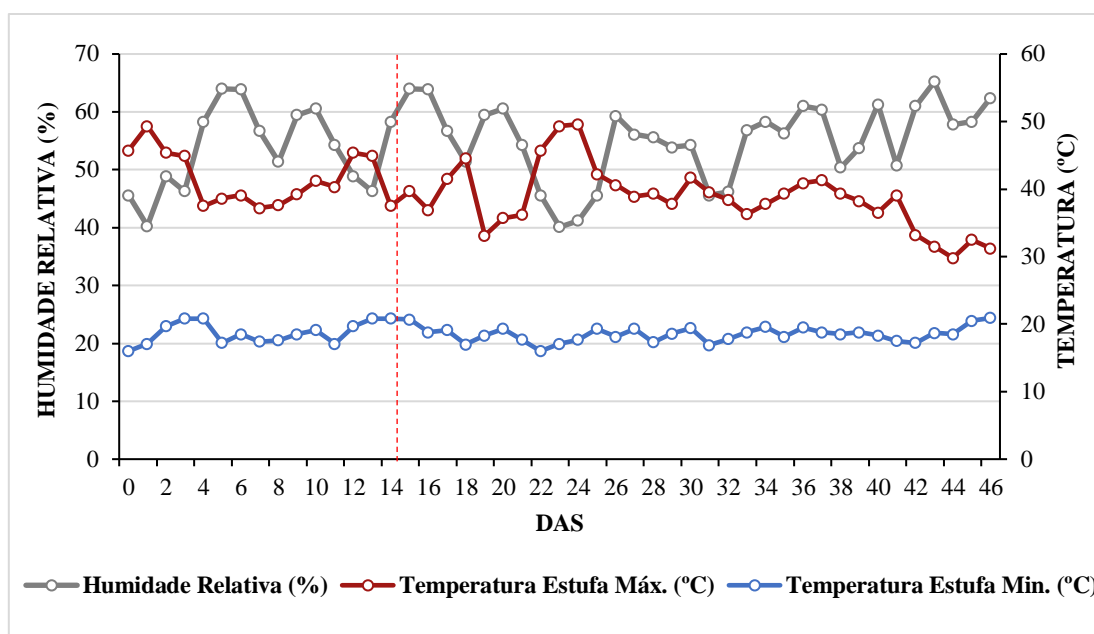


Figura 14 - Dados climáticos referentes ao período de realização da Fase Experimental II. O tracejado vermelho indica quando se iniciou a indução do déficit hídrico.

Nesta segunda fase do ensaio, houve uma maior variação da temperatura máxima e da humidade relativa ao longo do tempo. Relativamente às temperaturas máximas, os valores rondaram entre 30°C e 49,6°C, contudo as temperaturas estiveram maioritariamente na faixa de valores entre os 35°C e os 45°C. No que respeita aos valores da humidade relativa presente no interior da estufa, rondou valores entre 40,3% e 65,2%, no entanto a maior parte dos dias representava valores entre os 50% e os 60% de humidade relativa. A indução do déficit hídrico iniciou-se aos 15 DAS, para as plantas em vaso da modalidade CRH.

4.3.1. Efeitos do déficit hídrico analisados através da fenotipagem digital

Nas **figuras 15-24**, estão evidenciados os resultados obtidos pelas monitorizações através do equipamento *TraitFinder* (Phenospex, Holanda), efetuadas no decorrer da experiência.

4.3.1.1. Efeito do desenvolvimento da Área foliar

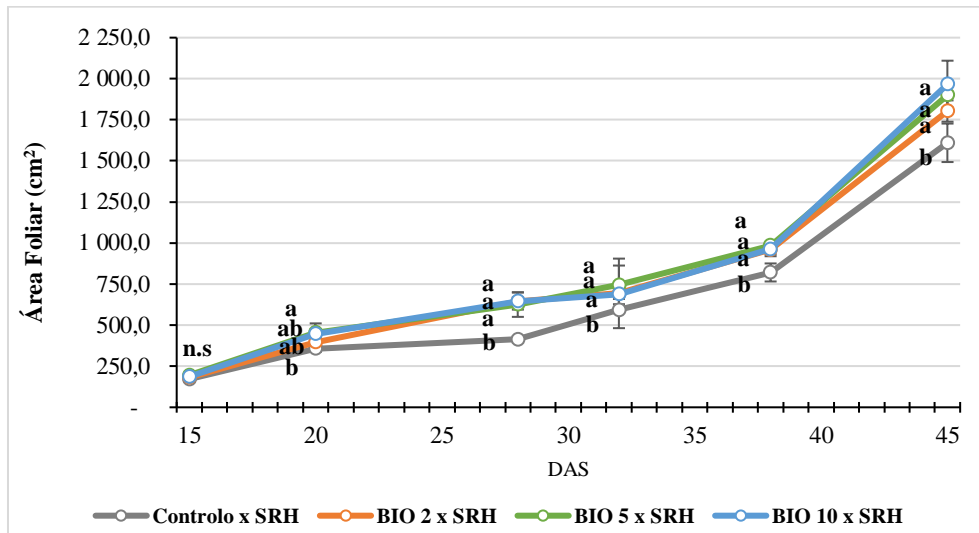


Figura 15 – Efeito dos diferentes tratamentos em condições SRH, na Área Foliar das plantas de milho, ao longo do tempo. Os pontos representam a média das 8 plantas \pm Desvio Padrão. Em cada tempo de avaliação, letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) e n.s representa não haver diferenças entre todos os tratamentos.

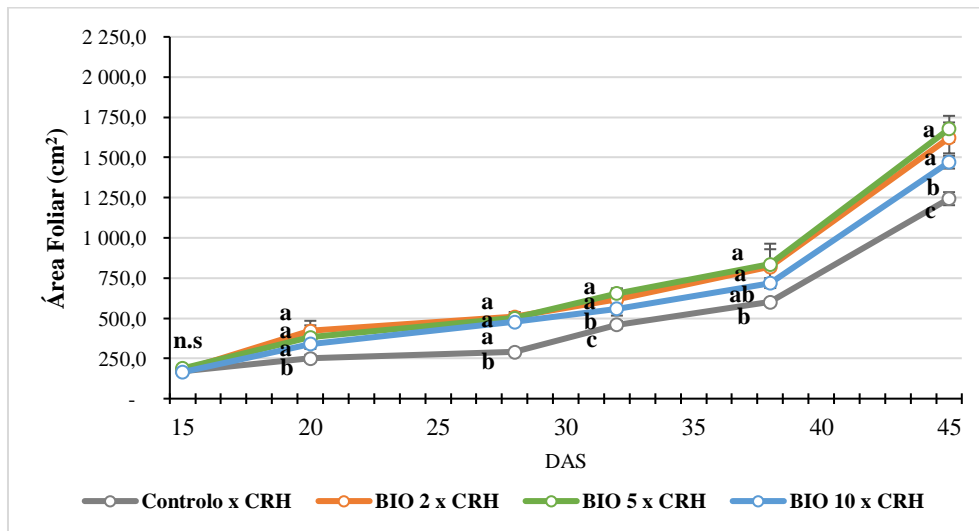


Figura 16 – Efeito dos diferentes tratamentos em condições CRH, na Área Foliar das plantas de milho, ao longo do tempo. Os pontos representam a média das 8 plantas \pm Desvio Padrão. Em cada tempo de avaliação, letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) e n.s representa não haver diferenças entre todos os tratamentos.

A área foliar na modalidade CRH, foi inferior à área foliar das plantas SRH, ficando evidente o efeito do stress hídrico induzido. Em ambas as modalidades, encontraram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) no aumento da área foliar das plantas de milho entre tratamentos com a aplicação dos bioestimulantes e as plantas Controlo na maioria dos tempos de avaliação. Este parâmetro discriminou as diferenças entre as plantas tratadas com bioestimulantes e o Controlo, desde os 20 DAS. O efeito positivo causado pelos bioestimulantes na área foliar das plantas de milho foi similar, contudo, a partir dos 32 e 45 DAS em condições CRH, os tratamentos Bio 2 e Bio 5 apresentaram valores significativamente superiores ($p < 0,05$) ao tratamento Bio 10.

Inclusivamente, na modalidade CRH, os tratamentos Bio 2 e Bio 5 destacaram-se por terem induzido nas plantas uma área foliar (1 621 cm² e 1 677 cm², respetivamente) não só superior às plantas Controlo (1 243 cm²) sob a redução de disponibilidade hídrica, como também elevaram ligeiramente o desenvolvimento final ao nível das plantas Controlo sem restrições hídricas (1 609 cm²) Estes resultados indicam que os tratamentos foram eficazes na mitigação dos efeitos negativos do défice hídrico, permitindo a promoção do crescimento nas plantas comparável ao observado em condições ideais de desenvolvimento.

O uso de bioestimulantes na promoção do aumento da área foliar sob condições de stress hídrico em plantas de milho é corroborado por diversos estudos científicos. Os bioestimulantes microbianos, incluindo bactérias promotoras do crescimento de plantas (PGPR) e fungos micorrízicos, têm demonstrado ser eficazes em mitigar os efeitos do stress hídrico, promovendo o crescimento das plantas e o desenvolvimento foliar. Fadiji *et al.* (2022) comprova que bioestimulantes tais como, *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus* spp. podem aumentar a área foliar de plantas submetidas ao stress hídrico, melhorando a absorção de nutrientes e a eficiência do uso da água. Estes microorganismos produzem fito-hormonas como auxinas, citocininas e giberelinas, possibilitando o estímulo do crescimento das plantas, mesmo sob condições de restrição hídrica. Além disso, os bioestimulantes têm a capacidade de produzir osmólitos, como a prolina, que ajudam as plantas a manter a turgidez celular durante períodos de baixa disponibilidade hídrica, permitindo um melhor desenvolvimento da área foliar. Como tal, Eswaran *et al.* (2024) relatou que o uso de bioestimulantes microbianos em plantas de amendoim sob stress hídrico, provocou um aumento significativo na área foliar comparando com as plantas controlo, sem qualquer tratamento.

4.3.1.2. Efeito no desenvolvimento da Altura da planta

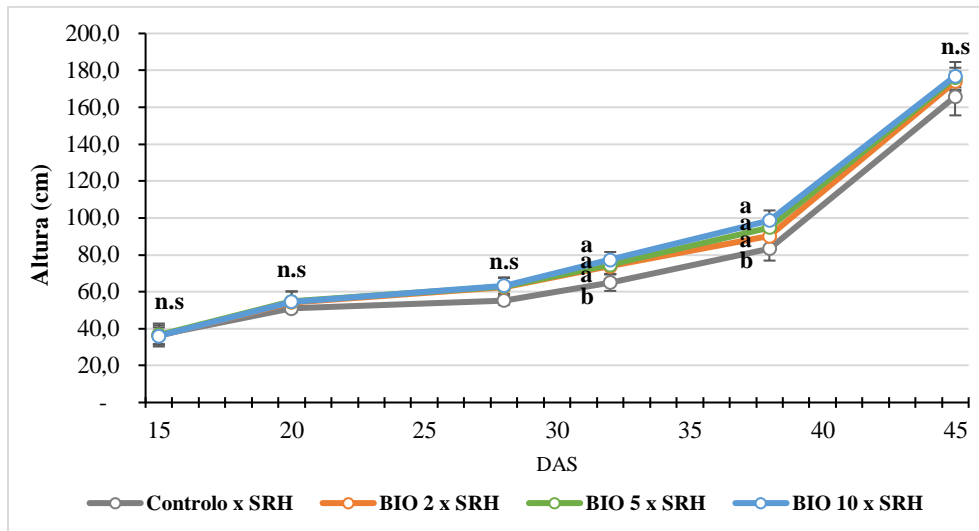


Figura 17 - Efeito dos diferentes tratamentos em condições SRH, na Altura das plantas de milho, ao longo do tempo. Os pontos representam a média das plantas \pm Desvio Padrão. Em cada tempo de avaliação, letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) e n.s representa não haver diferenças entre todos os tratamentos.

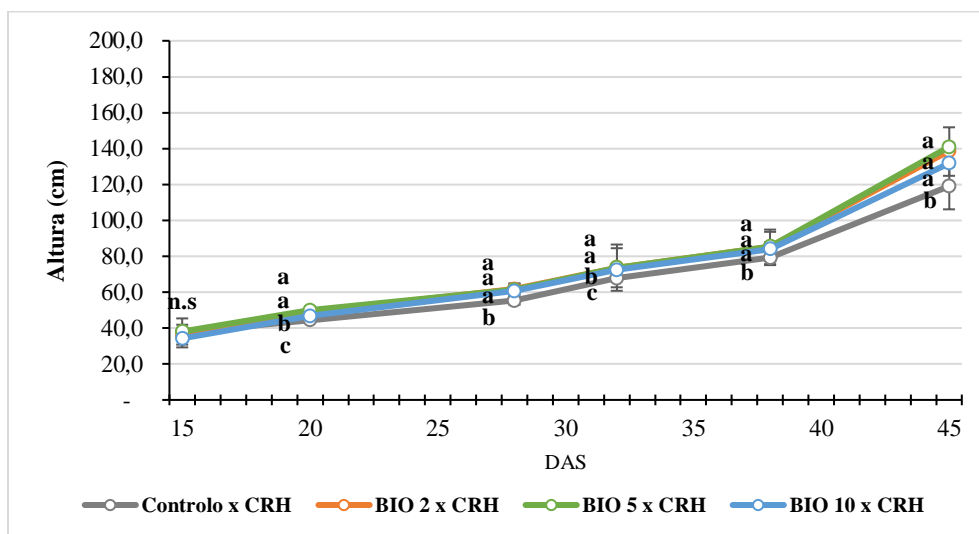


Figura 18 - Efeito dos diferentes tratamentos em condições CRH, na Altura das plantas de milho, ao longo do tempo. Os pontos representam a média das plantas \pm Desvio Padrão. Em cada tempo de avaliação, letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) e n.s representa não haver diferenças entre todos os tratamentos.

A altura das plantas na modalidade CRH, foi inferior à altura das plantas SRH, evidenciando o efeito do défice hídrico induzido. Na modalidade SRH, verificaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) no aumento da altura das plantas de milho, entre os tratamentos de bioestimulantes e o Controlo, aos 32 e 38 DAS. Em contrapartida, na modalidade CRH, esse efeito foi antecipado, com diferenças significativas ($p < 0,05$) na altura das plantas entre os tratamentos e o Controlo, a partir dos 20 DAS. No fim do ensaio, ambas

as modalidades hídricas não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos à base de bioestimulantes, contudo, na modalidade CRH aos 20 DAS e aos 32 DAS, os tratamentos Bio 2 e Bio 5 foram significativamente superiores ($p < 0,05$) ao tratamento Bio 10.

Tal como referido anteriormente, a aplicação de bioestimulantes pode induzir o crescimento das plantas sob condições de déficit hídrico. Por exemplo, um estudo realizado por Rouphael *et al.* (2022) mostrou como os bioestimulantes microbianos, incluindo bactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPR), podem melhorar a tolerância das plantas à falta de disponibilidade hídrica, aumentando a capacidade de absorção de nutrientes e água e promovendo a síntese de hormonas vegetais como auxinas e giberelinas, que irão favorecer o crescimento das plantas em condições adversas. Além disso, uma investigação publicada por Bose *et al.* (2020) verificou que a aplicação de *Bacillus subtilis* em plantas de milho sob déficit hídrico promoveu um aumento significativo na altura das plantas, associado a uma melhor resistência ao stress oxidativo e à melhoria na eficiência do uso da água.

Estes estudos reforçam a eficácia dos bioestimulantes microbianos ao promover o crescimento das plantas, especialmente em condições adversas de disponibilidade hídrica, através da melhoria de diversos parâmetros de crescimento e contribuindo para uma maior resiliência das culturas.

4.3.1.3. Parâmetro fisiológico: NDVI (Normalized Digital Vegetation Index)

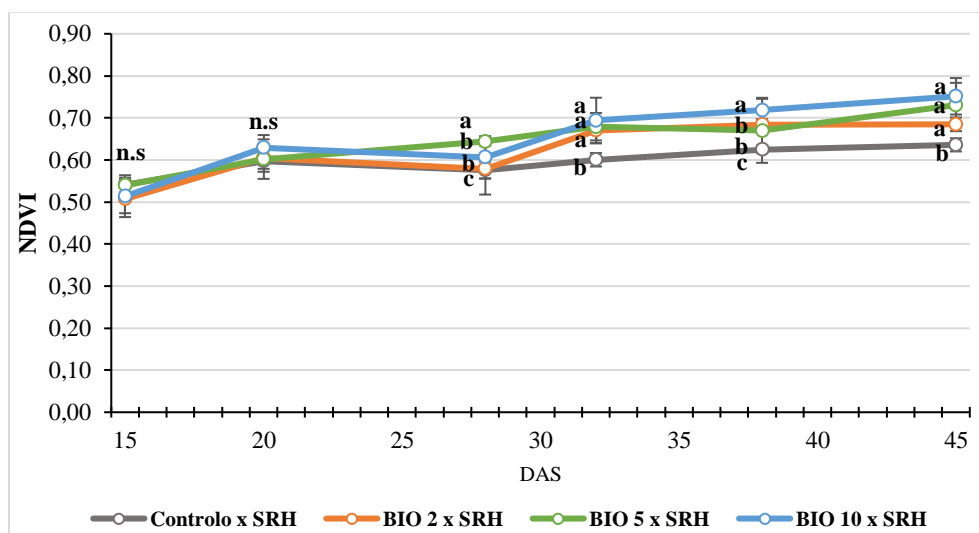


Figura 19 - Efeito dos diferentes tratamentos em condições SRH, no NDVI das plantas de milho, ao longo do tempo. Os pontos representam a média das plantas \pm Desvio Padrão. Em cada tempo de avaliação, letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) e n.s. representa não haver diferenças entre todos os tratamentos.

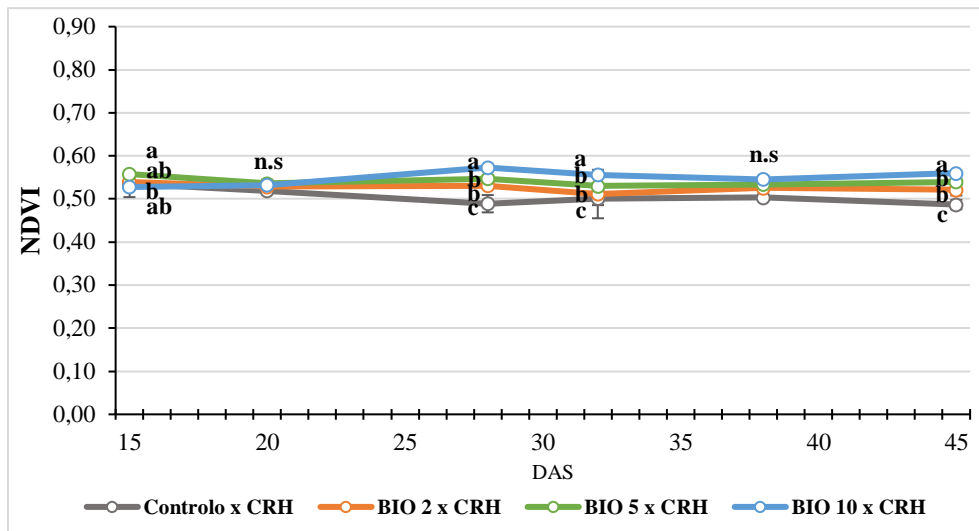


Figura 20 - Efeito dos diferentes tratamentos em condições CRH, no NDVI das plantas de milho, ao longo do tempo. Os pontos representam a média das plantas \pm Desvio Padrão. Em cada tempo de avaliação, letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) e n.s. representa não haver diferenças entre todos os tratamentos.

Em ambas as modalidades SRH e CRH, as diferenças significativas no índice de NDVI entre tratamentos de bioestimulantes e o Controlo só são evidentes a partir dos 28 DAS. Verificou-se que, em condições hídricas favoráveis, as plantas de milho tratadas com bioestimulantes apresentaram valores de NDVI próximos de 0,75, sendo significativamente superiores ($p < 0,05$) ao Controlo, contudo, não houve diferenças significativas entre os tratamentos Bio 2, Bio 5 e Bio 10. Sob condições de déficit hídrico, as plantas com os tratamentos de bioestimulantes mostraram valores mais baixos que em condições de SRH, mas significativamente superiores ($p < 0,05$) às plantas Controlo. Nesta última situação hídrica e a partir dos 28 DAS, verificaram-se diferenças significativas entre os bioestimulantes sendo que, o tratamento Bio 10 induziu resultados significativamente superiores aos tratamentos Bio 2 e Bio 5, exceto aos 38 DAS.

Existem vários estudos que indicam que os bioestimulantes podem melhorar significativamente o desempenho fisiológico das plantas, seja em condições hídricas favoráveis ou em situações de déficit hídrico. Tal como evidenciado por Franzoni *et al.* (2022) que mostrou que a aplicação de bioestimulantes em plantas, pode melhorar a tolerância a condições adversas, resultando numa maior eficiência fotossintética, indicada através de índices de vegetação (tal como o NDVI). Os resultados do seu trabalho mostraram que, em condições ideais, as plantas tratadas com bioestimulantes apresentaram valores de NDVI próximos de 0,8, e significativamente superiores às plantas Controlo, sem tratamento. Além disso, Ali *et al.* (2021) aborda como os bioestimulantes auxiliam na mitigação dos

efeitos do déficit hídrico, melhorando o crescimento e a produtividade das plantas. Este efeito é particularmente notável quando as plantas estão sob condições de déficit hídrico, onde os bioestimulantes ajudam a manter uma maior área foliar (tal como demonstrado anteriormente) e melhores índices de vegetação.

4.3.1.4. Parâmetro fisiológico: NPCI (Normalized Pigments Chlorophyll Index)

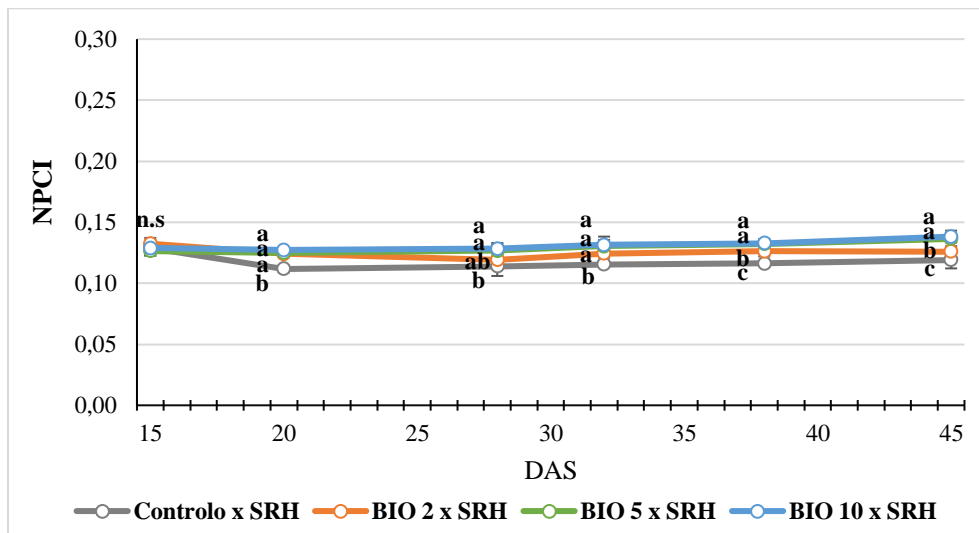


Figura 21 - Efeito dos diferentes tratamentos em condições SRH, no NPCI das plantas de milho, ao longo do tempo. Os pontos representam a média das plantas \pm Desvio Padrão. Em cada tempo de avaliação, letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) e n.s representa não haver diferenças entre todos os tratamentos.

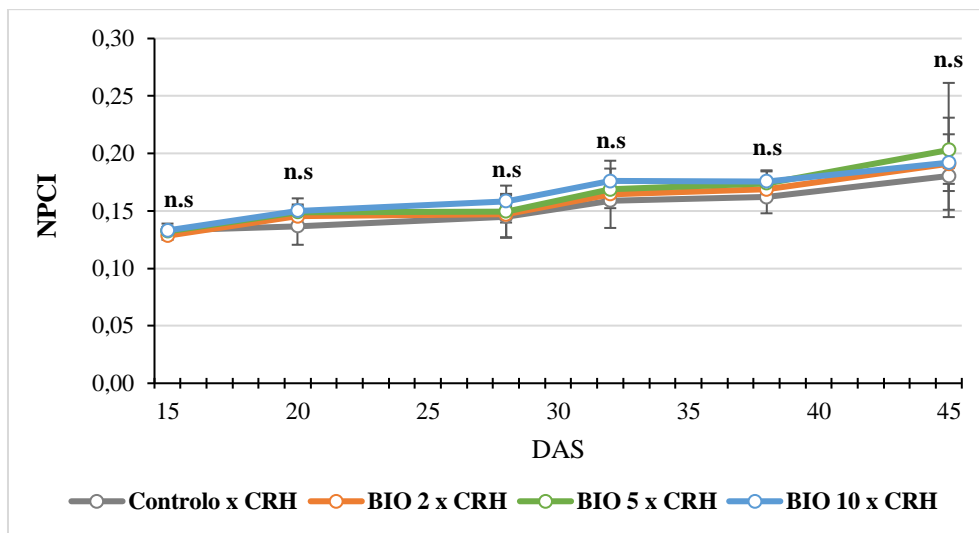


Figura 22 - Efeito dos diferentes tratamentos em condições CRH, no NPCI das plantas de milho, ao longo do tempo. Os pontos representam a média das plantas \pm Desvio Padrão. Em cada tempo de avaliação, letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) e n.s representa não haver diferenças entre todos os tratamentos.

Na modalidade SRH, as plantas de milho dos tratamentos de bioestimulantes foram significativamente superiores ($p < 0,05$) às plantas do Controlo, a partir dos 20 DAS. Contudo, os tratamentos Bio 5 e Bio 10 destacaram-se, sendo que apresentaram diferenças significativas comparativamente aos restantes tratamentos a partir dos 38 DAS. Na modalidade CRH, não se verificaram diferenças significativas entre tratamentos. Ainda assim, o tratamento Bio 5 apresentou valores de NPCI ligeiramente superiores aos restantes tratamentos, no final do ensaio.

Conforme indicado no **quadro 4** (no tópico 3.4.5.1), valores de NPCI entre 0,10 e 0,25 um maior conteúdo de clorofila nas plantas, enquanto valores superiores a 0,25 representam um menor conteúdo de clorofila. A análise dos gráficos revela que as plantas sob a modalidade SRH apresentam um conteúdo de clorofila mais elevado em comparação com as plantas sob a modalidade CRH. Isto, confirma que as plantas bem irrigadas mantêm os níveis mais altos de clorofila e, conseqüentemente, melhores valores de NPCI, em contraste com as plantas que sofrem de stress hídrico. Existem estudos que corroboram esta conclusão, como o trabalho de Wang *et al.* (2020), que mostrou que as plantas de soja sob stress hídrico apresentaram uma redução significativa tanto nos níveis de clorofila como na sua eficiência fotossintética, enquanto as plantas bem irrigadas mantiveram altos níveis de clorofila. Farooq *et al.* (2019) também demonstraram que o stress hídrico reduz o conteúdo de clorofila no milho, enquanto as plantas sem restrições hídricas conseguiram manter valores positivos, destacando a importância da disponibilidade hídrica para a saúde das plantas. Além disso, Féret *et al.* (2011) investigaram como a reflectância espectral pode ser usada para estimar o conteúdo de clorofila em árvores tropicais, confirmando que o stress hídrico afeta significativamente a reflectância e, portanto, o conteúdo de clorofila.

Em contraste, os resultados dos gráficos das **figuras 21 e 22** demonstram que a aplicação de bioestimulantes apresentaram, nas plantas, valores de NPCI superiores comparativamente às plantas Controlo. Contudo, mesmo que as plantas tratadas com bioestimulantes apresentem níveis de clorofila mais baixos em comparação com as plantas do Controlo, isso não significa necessariamente que a saúde das plantas ou a eficiência fotossintética esteja comprometida, apoiado no facto de que os bioestimulantes têm a capacidade de provocar uma redistribuição dos recursos metabólicos (Rouphael *et al.*, 2020), de aumentar a eficiência fotossintética, de melhorar a absorção de nutrientes (du Jardin, 2015) e, por fim, de possuir uma ação hormonal nas plantas (Calvo, 2014).

4.3.1.5. Parâmetro fisiológico: GLI (*Green Leaf Index*)

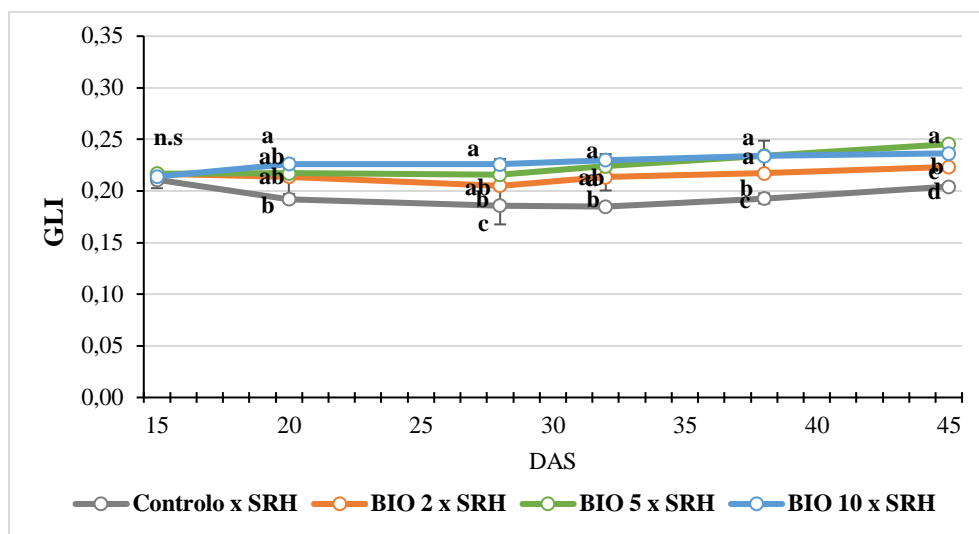


Figura 23 - Efeito dos diferentes tratamentos em condições SRH, no GLI das plantas de milho, ao longo do tempo. Os pontos representam a média das plantas \pm Desvio Padrão. Em cada tempo de avaliação, letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) e n.s representa não haver diferenças entre todos os tratamentos.

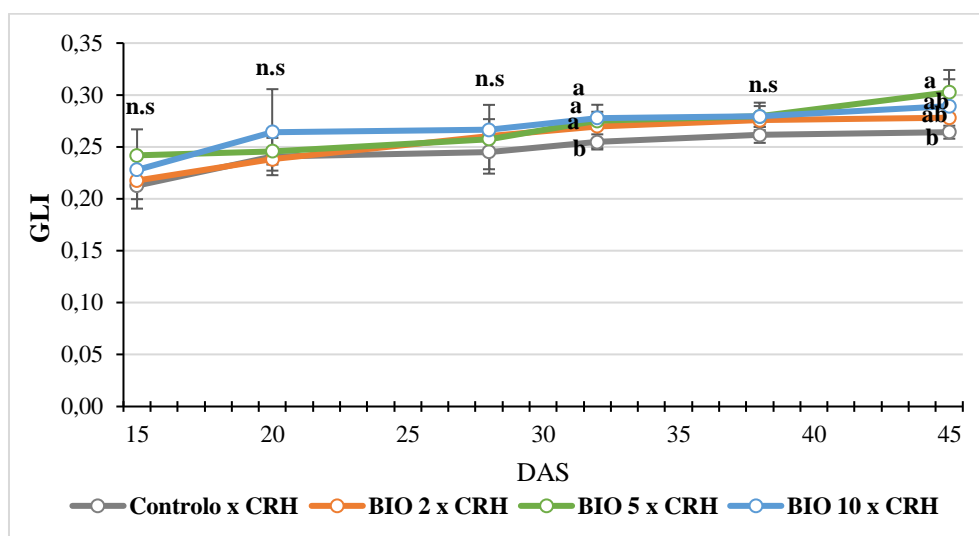


Figura 24 - Efeito dos diferentes tratamentos em condições CRH, no GLI das plantas de milho, ao longo do tempo. Os pontos representam a média das plantas \pm Desvio Padrão. Em cada tempo de avaliação, letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$) e n.s representa não haver diferenças entre todos os tratamentos.

Na modalidade SRH, observaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) no aumento do GLI entre tratamentos de bioestimulantes e o Controlo, a partir dos 20 DAS até ao término do ensaio, sendo que o tratamento Bio 5 foi geralmente significativamente superior aos restantes tratamentos. Ainda SRH, os tratamentos Bio 2 e Bio 10 foram significativamente diferentes e superiores ao Controlo. Na modalidade CRH, verificaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos de bioestimulantes e o Controlo, a partir dos 32

DAS. No entanto, no fim do ensaio, o tratamento Bio 5 destacou-se por ser o único significativamente superior ao Controlo.

O GLI, é um parâmetro de medida bastante associado aos critérios de avaliação do parâmetro NPCI, sendo um índice associado às variações do pigmento verde presente nas plantas e, tal como indicado no **Quadro 4** (no tópico 3.4.5.1.), quanto maior for o valor, menor será o conteúdo de pigmento verde presente nas plantas. A análise dos gráficos revela que as plantas sob a modalidade SRH apresentam concentrações do pigmento verde superiores em comparação com as plantas sob a modalidade CRH. Uma consequência derivada pela indução do stress hídrico. Contudo, e em semelhança aos resultados do **tópico 4.3.1.4.** (NPCI), a aplicação dos bioestimulantes apresentou valores superiores de GLI, em ambas as modalidades, indicando um menor conteúdo do pigmento verde nas plantas, comparativamente ao Controlo.

Analisando os resultados obtidos do **tópico 4.3.1.**, comprovou-se que os bioestimulantes, mesmo em pequenas quantidades, podem promover o crescimento e o desenvolvimento das plantas. Isso ocorre devido à sua ação através de múltiplos mecanismos, incluindo a modulação do metabolismo das plantas, a melhoria na absorção de nutrientes e o aumento da resistência ao stress. Dessa forma, apresentam-se as razões pelas quais as plantas tratadas com bioestimulantes podem ter níveis de clorofila e de pigmento verde mais baixos, mas ainda assim exibirem um crescimento morfológico superior em comparação com as plantas do Controlo:

Redistribuição de Recursos Metabólicos: os bioestimulantes conseguem induzir uma redistribuição dos recursos dentro da planta, priorizando o crescimento morfológico em vez da produção de clorofila e de pigmentos verdes. Isso, pode originar uma concentração menor de pigmento verde (GLI), e apresentar biomassa finais superiores. (Rouphael *et al.*, 2020)

Aumento da Eficiência Fotossintética: os bioestimulantes podem aumentar a eficiência fotossintética por unidade de clorofila e por unidade de área foliar, o que significa que mesmo com menos clorofila e pigmento verde, a planta pode ser mais eficiente a converter a luz em energia química. (Rouphael *et al.*, 2020)

Melhoria na Absorção de Nutrientes: os bioestimulantes, frequentemente, melhoram a capacidade das plantas na absorção e na posterior utilização dos nutrientes do solo, o que pode compensar os níveis mais baixos de clorofila e pigmentos verdes, suportando um crescimento mais robusto. (du Jardin, 2015)

Ação Hormonal: muitos bioestimulantes contêm hormonas vegetais ou precursores hormonais que podem promover o alongamento celular e a divisão celular, resultando num crescimento morfológico mais significativo sem necessariamente aumentar o conteúdo de pigmento verde. (Calvo, 2014)

Ou seja, ainda que as plantas tratadas com bioestimulantes apresentem níveis de clorofila e de pigmento verde mais baixos, os efeitos positivos dos bioestimulantes no crescimento morfológico podem ser atribuídos a uma série de fatores que otimizam a eficiência fotossintética, a absorção de nutrientes e a resistência ao stress. O que, conseqüentemente, resulta num crescimento mais robusto e vigoroso.

4.3.2. Efeitos do déficit hídrico analisados através das medidas finais

4.3.2.1. Fluorescência modulada da clorofila *a*

Os dados da fluorescência da clorofila *a* fornecem informações importantes sobre a competência fotossintética das espécies vegetais.

A razão entre a fluorescência variável máxima (F_v) e a fluorescência máxima (F_m) indica a eficiência da conversão de energia pelos centros de reacção do PSII que se encontram abertos, na ausência de fenómenos de amortecimento não-fotoquímico. Na **figura 25**, observa-se a variação deste parâmetro sob a aplicação de bioestimulantes, nos dois regimes hídricos.

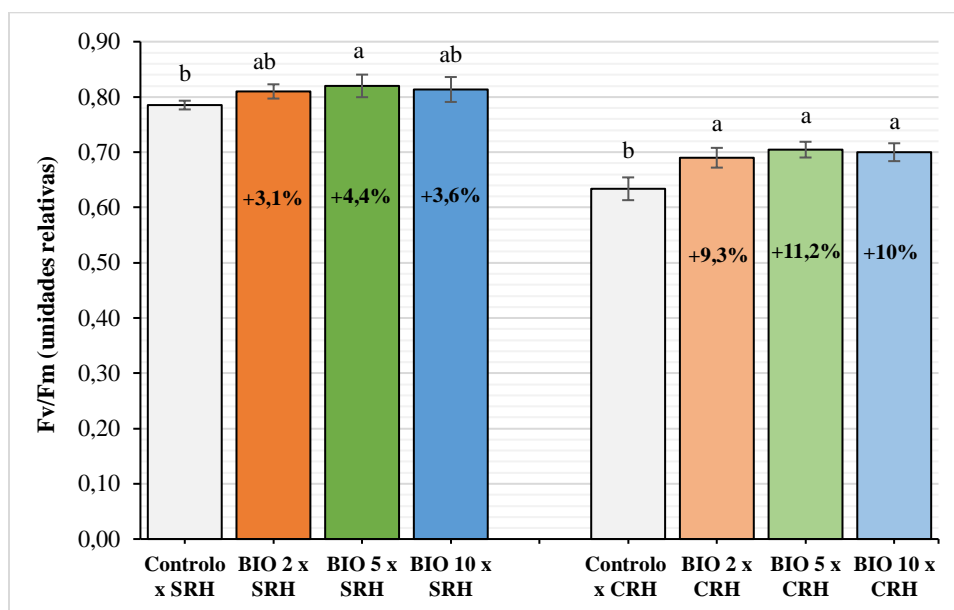


Figura 25 - Efeito da ação dos diferentes tratamentos em condições SRH e CRH, na variação do rendimento quântico do PSII (F_v/F_m). Os resultados foram obtidos de 3 folhas de cada planta de milho. As barras representam a média das plantas \pm Desvio Padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas ($P < 0,05$). As percentagens representam os acréscimos/decréscimos dos tratamentos de bioestimulantes comparativamente ao tratamento Controlo, de cada modalidade.

Em condições hídricas favoráveis, as plantas de milho dos tratamentos de bioestimulantes e do Controlo apresentaram valores próximos das 0,8 unidades relativas na hidratação máxima, todavia, só as plantas de milho do tratamento Bio 5 apresentaram valores significativamente superiores ($p < 0,05$) às plantas do Controlo, não havendo diferenças significativas entre os tratamentos de bioestimulantes. Sob condições de déficit hídrico, os valores de F_v/F_m das plantas dos tratamentos de bioestimulantes apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) comparados com o Controlo que obteve uma média de 0,6, enquanto os bioestimulantes apresentam valores próximos de 0,7, o que nos indica uma maior tolerância ao déficit hídrico. Entre os tratamentos de bioestimulantes não houve diferenças significativas.

Em concordância com os resultados obtidos, diversos trabalhos comprovaram que a aplicação de bioestimulantes aumentam os valores de F_v/F_m na planta, tanto em condições ideais quanto sob o déficit hídrico. Mishra *et al.* (2012) revelaram que as plantas de tomate submetidas ao déficit hídrico apresentaram aumentos significativos nos valores de F_v/F_m quando foram tratadas com o bioestimulante “Crop +”. Neste estudo, perante o déficit hídrico, as plantas tratadas alcançaram valores de F_v/F_m de 0,84, e as plantas em condições ideais alcançaram 0,81, demonstrando não só a eficácia dos bioestimulantes na melhoria da eficiência fotossintética como também a tolerância ao déficit hídrico. Ademais, a razão pela qual os bioestimulantes aumentam os valores de F_v/F_m está associada à sua capacidade de promover a síntese de hormonas de crescimento e antioxidantes, como auxinas e citocininas, que ajudam a regular processos fisiológicos e bioquímicos nas plantas. Além disso, os bioestimulantes estimulam a atividade de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), que protegem as plantas contra danos oxidativos causados pelo déficit hídrico (Peripolli *et al.*, 2021).

4.3.2.2. Peso fresco: da parte radicular e da parte aérea

Na **figura 26**, estão evidenciados os resultados obtidos do Peso Fresco, da parte radicular e da parte aérea, das plantas de milho por tratamento.

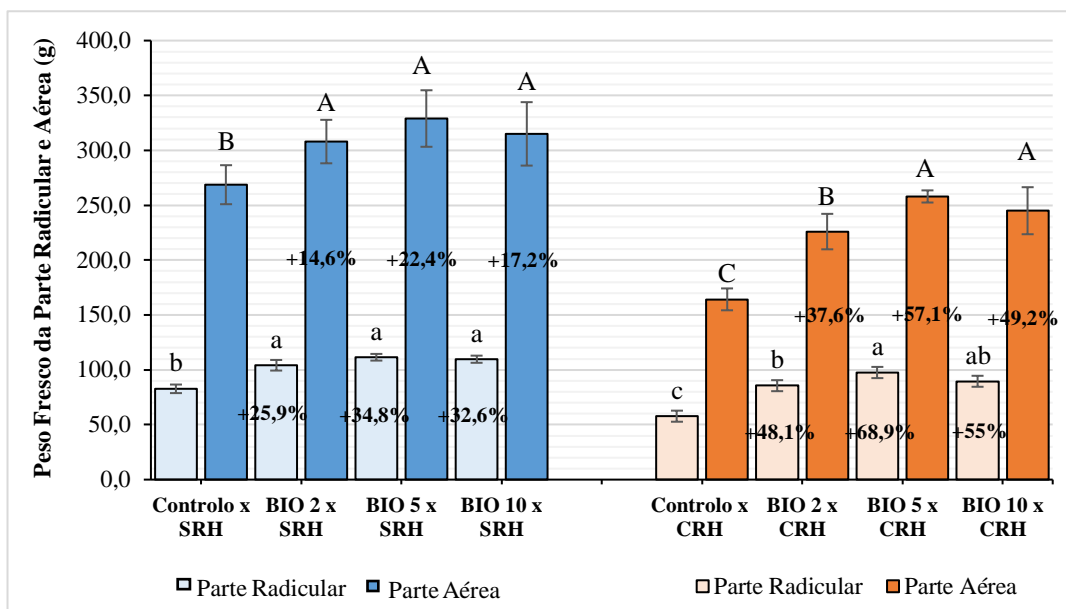


Figura 26 - Efeito da ação dos diferentes tratamentos em condições SRH e CRH, no peso fresco das plantas de milho. As barras representam a média das plantas \pm Desvio Padrão. Em cada regime hídrico e por cada parte da planta, letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$). As percentagens representam os acréscimos/decréscimos dos tratamentos de bioestimulantes comparativamente ao tratamento Controlo, de cada modalidade.

Na modalidade SRH, foi observado um aumento significativo ($p < 0,05$) no peso fresco tanto da parte radicular quanto da parte aérea das plantas tratadas com bioestimulantes em comparação com as plantas Controlo. Este aumento pode ser explicado pela estimulação do crescimento radicular que, conseqüentemente irá facilitar a absorção de água e nutrientes do solo.

Na modalidade CRH, também foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos de bioestimulantes e o controlo. Lucini *et al.* (2015) observaram que a aplicação de bioestimulantes à base de microrganismos em plantas de tomate induziu um aumento significativo no peso fresco da parte aérea, mesmo sob condições de déficit hídrico. Este efeito foi atribuído à capacidade dos bioestimulantes de melhorar a eficiência do uso da água e de promover a síntese de hormonas de crescimento, como auxinas e giberelinas. Estudos de Rouphael *et al.* (2020) também indicaram que os bioestimulantes podem melhorar a resistência das plantas ao déficit hídrico, promovendo a acumulação de osmólitos compatíveis e antioxidantes que protegem as células vegetais contra danos oxidativos. No que diz respeito ao aumento do peso fresco da parte aérea em condições CRH, os

tratamentos Bio 5 e Bio 10 foram significativamente superiores ao tratamento Bio 2, sugerindo que as diferentes estirpes de bactérias podem ter efeitos variáveis na promoção do crescimento da parte aérea perante situações de déficit hídrico. Em relação ao peso fresco da parte radicular, o tratamento Bio 10 não teve diferenças significativas para com os tratamentos Bio 2 e Bio 5, contudo este último provocou um aumento significativo ($p < 0,05$) comparativamente ao tratamento Bio 2. Nas **figuras 27 e 28**, os resultados são ilustrados através de fotografias que revelam o estado de desenvolvimento das plantas de milho para cada tratamento, no final do estudo.

Resultados como estes, destacam a eficácia dos bioestimulantes na melhoria do crescimento e na resistência ao déficit hídrico, o que é corroborado por diversos estudos na literatura científica.

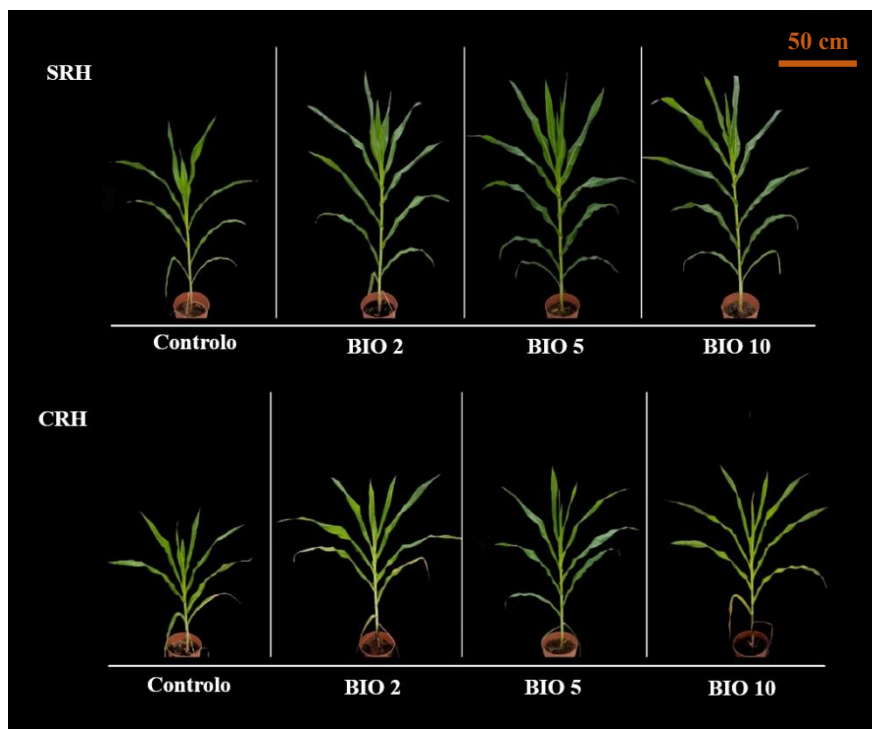


Figura 27 - Comparação do efeito da ação dos diferentes tratamentos em condições sem restrições hídricas (SRH) e com restrições hídricas (CRH), no desenvolvimento da parte aérea das plantas de milho. A barra de escala vermelha indica 50 cm de comprimento em cada planta.

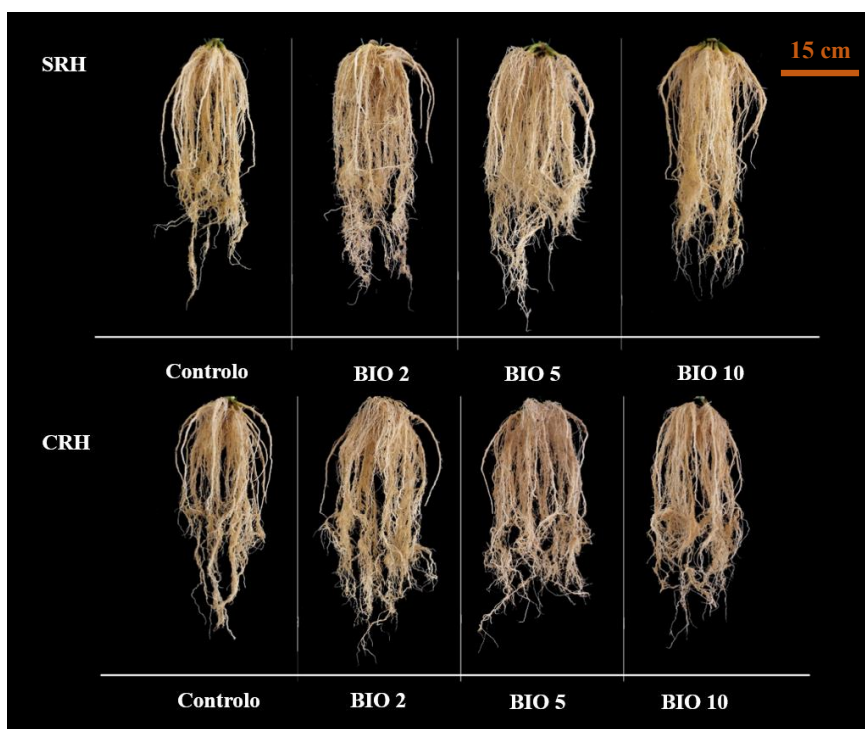


Figura 28 - Comparação do efeito da ação dos diferentes tratamentos em condições sem restrições hídricas (SRH) e com restrições hídricas (CRH), no desenvolvimento da parte aérea das plantas de milho. A barra de escala vermelha indica 15 cm de comprimento em cada raiz.

4.3.2.3. Biomassa total

Na **figura 29**, estão evidenciados os resultados obtidos na Biomassa Total das plantas de milho sob a aplicação de bioestimulantes, nas duas modalidades hídricas.

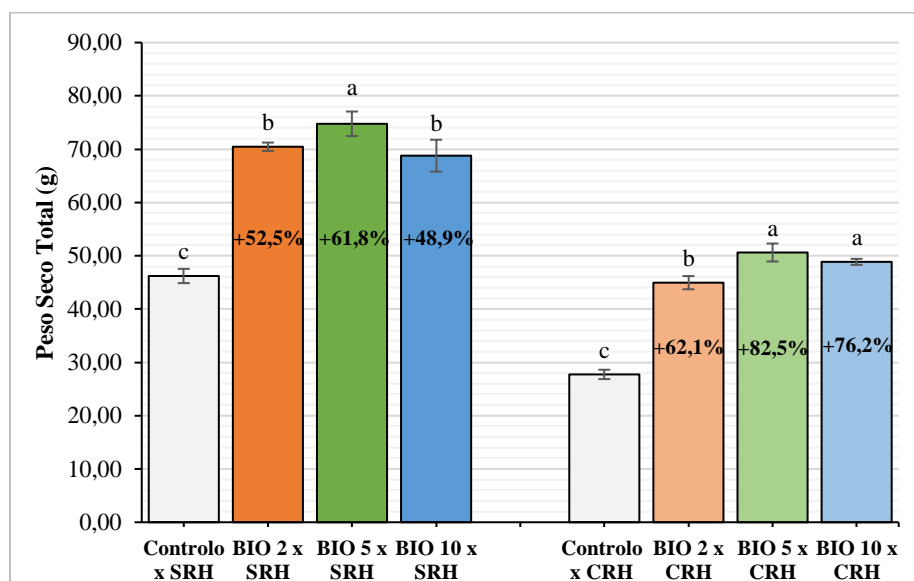


Figura 29 - Efeito da ação dos diferentes tratamentos em condições SRH e CRH, na Biomassa Total das plantas de milho. As barras representam a média das plantas \pm Desvio Padrão. Em cada regime hídrico, letras diferentes representam diferenças significativas ($P < 0,05$). As percentagens representam os acréscimos/decréscimos dos tratamentos de bioestimulantes comparativamente ao tratamento Controlo, de cada modalidade.

Em condições de conforto hídrico, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as plantas de milho dos tratamentos de bioestimulantes e do Controlo. Em particular, o tratamento Bio 5 foi significativamente diferente ($p < 0,05$) dos tratamentos Bio 2 e Bio 10, sugerindo que certas formulações de bioestimulantes podem ser mais eficazes na promoção do crescimento da biomassa.

Na modalidade SRH, observou-se um aumento significativo na biomassa total das plantas de milho tratadas com bioestimulantes em comparação com as plantas do Controlo. Além disso, os tratamentos Bio 5 e Bio 10 foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) do tratamento Bio 2, evidenciando novamente a variabilidade na eficácia de diferentes formulações de bioestimulantes em promover o crescimento da biomassa em condições de défice hídrico (Peripolli *et al.*, 2021).

4.3.2.4. Razão da biomassa da parte radicular X Parte aérea (*Root-Shoot Ratio*)

Tendo em conta os pesos secos obtidos na parte radicular e na parte aérea, através deste índice consegue-se aferir sobre a partição da biomassa durante o tempo de duração do ensaio, ou seja, se as plantas de milho investiram mais ou menos na parte radicular perante condições hídricas desfavoráveis e entender qual foi a resposta perante a aplicação dos bioestimulantes. Este índice varia ao longo do ciclo da planta, sendo mais representativo na fase do crescimento vegetativo, visto representar uma adaptação da planta às condições ambientais e à informação genética da variedade. Por exemplo, as alterações da disponibilidade hídrica no solo, induzem uma alocação de carbono resultante da fotossíntese para a parte radicular de forma a aumentar a absorção de água e nutrientes limitantes nessas situações, promovendo a resistência ao stress hídrico (Bláha, 2019).

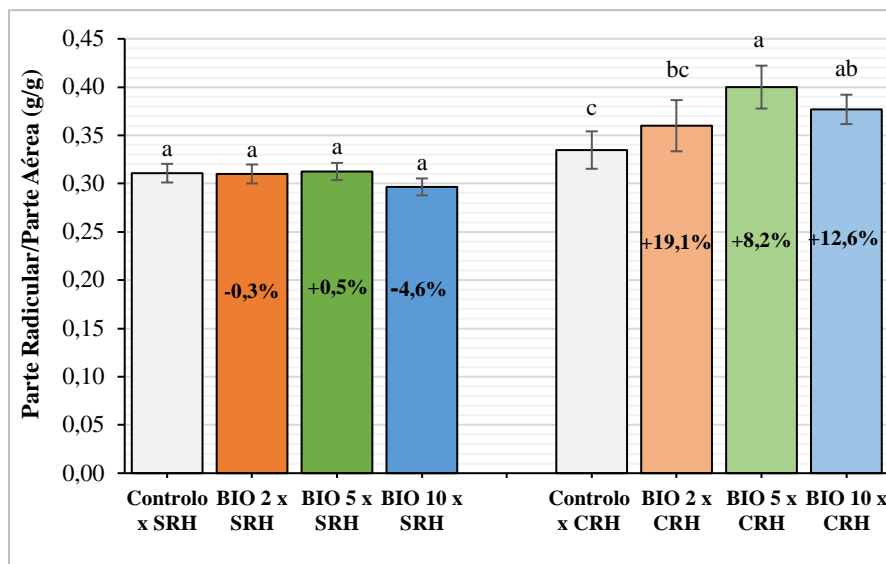


Figura 30 - Efeito da ação dos diferentes tratamentos em condições SRH e CRH, na razão da Biomassa da Parte Radicular com a Biomassa da Parte Aérea, das plantas de milho. As barras representam a média das plantas \pm Desvio Padrão. Em cada regime hídrico, letras diferentes representam diferenças significativas ($P < 0,05$). As percentagens representam os acréscimos/decréscimos dos tratamentos de bioestimulantes comparativamente ao tratamento Controlo, de cada modalidade.

Estudos comprovam que a aplicação de bioestimulantes pode ter diferentes efeitos na razão da biomassa entre a parte radicular e a parte aérea das plantas, dependendo das condições hídricas.

Como tal, na modalidade SRH não houve diferenças significativas entre os tratamentos de bioestimulantes e o controlo. Isso, pode ser explicado através do crescimento proporcional, radicular e foliar, quando não há restrições hídricas, conforme observado por Roupael *et al.* (2020), que demonstrou que em condições ideais, os bioestimulantes promovem um crescimento equilibrado sem alterar significativamente essa proporção.

No entanto, na modalidade CRH, houve um aumento significativo ($p < 0,05$) na razão entre a parte radicular e a parte aérea nas plantas de milho dos tratamentos Bio 5 e Bio 10 em comparação com as plantas do Controlo. Este aumento não foi observado nas plantas do tratamento Bio 2, que não diferiram significativamente das plantas do controlo.

Assim, pode-se deduzir que, em condições sem limitações hídricas, a aplicação de bioestimulantes promove um crescimento geral nas plantas, sem alterar a razão entre a parte radicular e a parte aérea, pois o crescimento é proporcional. No entanto, sob condições de défice hídrico, os bioestimulantes incentivam um maior desenvolvimento do sistema radicular em relação à parte aérea, como evidenciado nos estudos de Calvo *et al.* (2014) e Zou *et al.* (2019), que comprovaram que plantas sob défice hídrico com a aplicação de

bioestimulantes investem mais nas raízes para melhorar a captação de água e nutrientes, aumentando consequentemente a resistência a stresses abióticos.

Resultados como estes, indicam que a resposta das plantas ao uso de bioestimulantes também pode ser modulada pelas condições ambientais, sendo que em situações de déficit hídrico, os bioestimulantes auxiliam as plantas a adaptar as suas estratégias de crescimento para melhor enfrentar quaisquer adversidades.

4.3.2.5. Conteúdo de água presente nas folhas (*Leaf Water Content*)

Através dos resultados do peso fresco e do peso seco das folhas das plantas de milho, foi possível determinar o conteúdo de água presente nas folhas através da seguinte fórmula:

$$\text{Conteúdo de Água (\%)} = \frac{\text{Peso Fresco} - \text{Peso Seco}}{\text{Peso Fresco}} \times 100$$

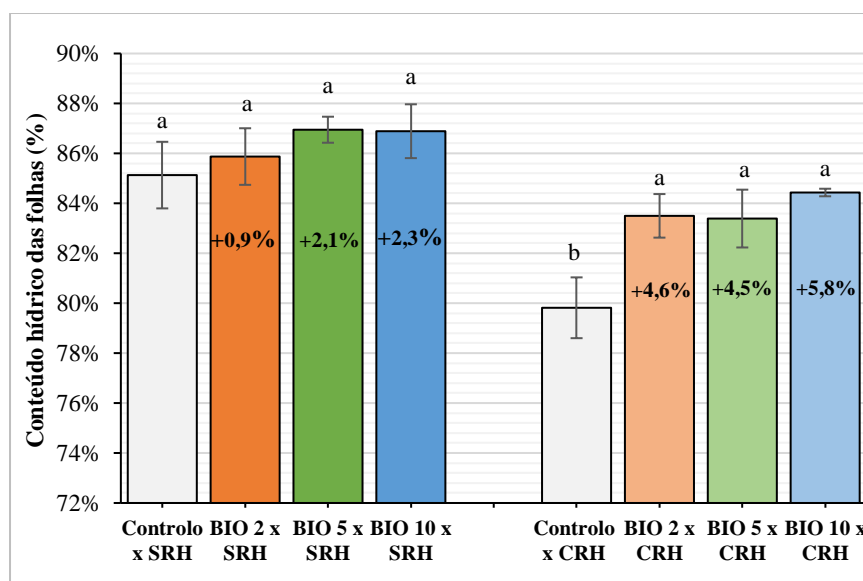


Figura 31 - Efeito da ação dos diferentes tratamentos em condições SRH e CRH, no conteúdo de água presente nas folhas das plantas de milho. As barras representam a média das plantas \pm Desvio Padrão. Em cada regime hídrico, letras diferentes representam diferenças significativas ($P < 0,05$). As percentagens representam os acréscimos/decréscimos dos tratamentos de bioestimulantes comparativamente ao tratamento Controlo, de cada modalidade.

Tal como se verificou no tópico anterior, a aplicação de bioestimulantes pode influenciar o conteúdo de água nas folhas das plantas, conforme a situação hídrica.

Na modalidade SRH, não houve diferenças significativas entre os tratamentos de bioestimulantes e o Controlo, ainda que tenham induzido acréscimos de valores entre 1% e 2%. Apesar de um aumento ligeiro, isto, sugere que, mesmo sem déficit hídrico, os

bioestimulantes podem melhorar a capacidade de retenção de água nas folhas, como observado por Calvo *et al.* (2014), que relatou benefícios semelhantes em plantas de milho tratadas com bioestimulantes sob condições ideais de crescimento.

Na modalidade CRH, os tratamentos de bioestimulantes apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) no conteúdo de água das folhas das plantas de milho comparativamente às plantas do Controlo. Tal, é corroborado por estudos de Rouphael *et al.* (2018), que também mostraram que os bioestimulantes podem aumentar a resistência ao déficit hídrico nas plantas de milho, promovendo uma melhor retenção de água nas folhas, o que é crucial para a manutenção da fotossíntese e outras funções fisiológicas sob condições adversas.

Em condições de déficit hídrico, o conteúdo de água nas folhas tende a diminuir devido à transpiração e ao processo de fotossíntese. Este comportamento foi observado nas plantas do controlo na modalidade CRH. As plantas tratadas com bioestimulantes, por outro lado, mantiveram um conteúdo hídrico mais elevado nas folhas. Isso, pode dever-se à capacidade dos bioestimulantes de ajudar na regulação estomática, permitindo que as plantas controlem melhor a abertura e o fecho dos estomas de acordo com suas necessidades reais. Assim, impede-se a perda excessiva de água devido ao stress abiótico, conforme destacado por Zhang *et al.* (2020), que também constataram que os bioestimulantes ajudaram as plantas a desenvolver mecanismos de resistência ao déficit hídrico, incluindo a regulação estomática e a síntese de osmólitos, promovendo uma maior retenção de água essencial para a sobrevivência e para produtividade das plantas.

4.3.2.6. Diâmetro do caule

Na **figura 32**, estão evidenciados os resultados obtidos no Diâmetro do Caule das plantas de milho sob a aplicação de bioestimulantes, nos dois regimes hídricos.

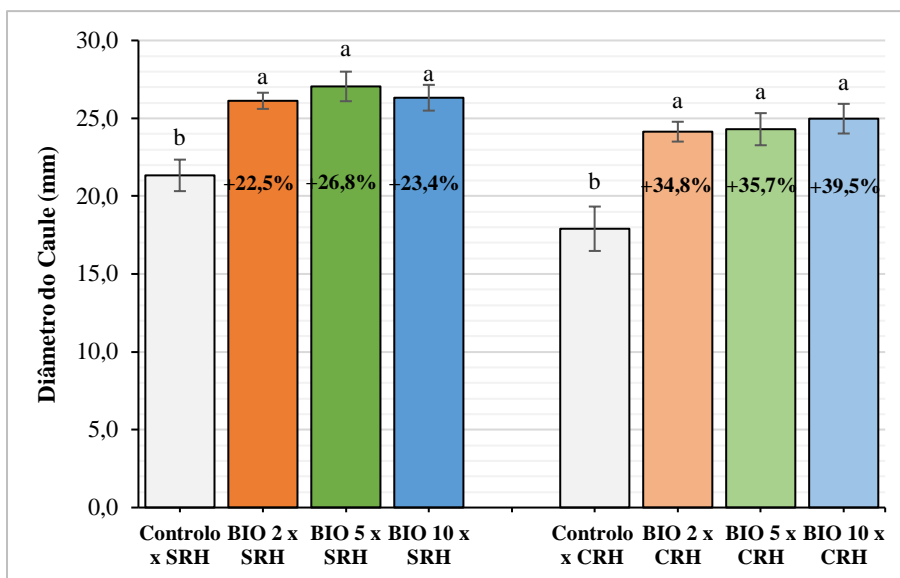


Figura 32 - Efeito da ação dos diferentes tratamentos em condições SRH e CRH, no Diâmetro do Caule médio das plantas de milho. As barras representam a média das plantas \pm Desvio Padrão. Em cada regime hídrico, letras diferentes representam diferenças significativas ($p < 0,05$). As porcentagens representam os acréscimos/decrécimos dos tratamentos de bioestimulantes comparativamente ao tratamento Controle, de cada modalidade.

Tanto na modalidade SRH quanto na modalidade CRH, as plantas de milho dos tratamentos de bioestimulantes apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) no diâmetro do caule comparativamente às plantas do Controle. No entanto, não houve diferenças significativas entre os diferentes tratamentos de bioestimulantes.

Em condições SRH, o diâmetro do caule das plantas tratadas com bioestimulantes aumentou de forma significativa comparado com o controle, tal como demonstrado nos estudos de Colla *et al.* (2017), que observaram que os bioestimulantes com base em algas marinhas e PGPR conseguem melhorar o crescimento estrutural das plantas, resultando num maior diâmetro dos caules.

Ora, a influência das diferentes modalidades hídricas é evidente ao comparar o diâmetro do caule com as plantas do controle. Sob condições de stress hídrico (CRH), as plantas de controle apresentaram uma redução no diâmetro do caule. No entanto, as plantas tratadas com bioestimulantes não só mitigaram essa redução, como também conseguiram igualar o diâmetro do caule das plantas de controle sob condições hídricas favoráveis. Este efeito adaptativo é suportado por estudos como os de Zhang *et al.* (2020), que demonstraram

que os bioestimulantes podem induzir respostas fisiológicas que compensam as limitações impostas pelo déficit hídrico, promovendo um crescimento equilibrado e robusto.

Neste estudo, pode-se concluir que os bioestimulantes são eficazes na promoção do crescimento do diâmetro do caule nas plantas de milho, independentemente das condições hídricas, com um impacto particularmente positivo em situações de déficit hídrico. Consequentemente, um aumento no diâmetro do caule nas plantas poderá proporcionar diversas vantagens, tais como:

Uma maior estabilidade e resistência física: pois, irá aumentar a estabilidade da planta, reduzindo o risco de tombamento ou quebra. Além disso, plantas com caules mais robustos são mais capazes de suportar o peso dos frutos e folhas, mantendo-se eretas e saudáveis.

Melhor Transporte de Nutrientes e Água: irá permitir uma melhor condução de água e nutrientes entre as raízes e a parte aérea da planta. Sendo crucial para o crescimento e desenvolvimento da planta, especialmente em períodos de rápido crescimento ou durante o déficit hídrico, onde a eficiência no uso de recursos é essencial.

Aumento da Capacidade Fotossintética: as plantas com caules de maior diâmetro frequentemente têm uma maior área foliar e capacidade fotossintética, o que irá contribuir para um crescimento mais vigoroso e uma maior produção de biomassa.

Melhoria na Resistência a Stresses Bióticos e Abióticos: pode atuar como uma barreira física contra pragas e doenças. Além disso, estudos indicam que plantas com caules mais robustos são mais eficientes na gestão de stresses abióticos, como seca e salinidade, através de um sistema radicular mais desenvolvido e uma melhor regulação estomática.

Aumento da Produtividade: Em muitas culturas, está associado a um aumento na produção de frutos ou sementes. Isso, deve-se ao fato de que as plantas com caules mais robustos são, geralmente, mais saudáveis e capazes de sustentar uma maior carga de produção sem comprometer a integridade estrutural. (Calvo *et al.*, 2014; Roupheal *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020)

4.3.2.7. Análises de material vegetal

No **quadro 5**, estão evidenciados os resultados obtidos nas análises do material vegetal das plantas de milho sob a aplicação de bioestimulantes, nas duas modalidades hídricas.

Quadro 5 – Efeito dos diferentes tratamentos em condições SRH e CRH, nas análises de material vegetal, através de amostras compostas.

	Controlo x SRH	BIO 2 x SRH	BIO 5 x SRH	BIO 10 x SRH	Controlo x CRH	BIO 2 x CRH	BIO 5 x CRH	BIO 10 x CRH
N (%)	0,58	1,02	1,09	0,88	0,81	0,95	1,02	1,17
P (%)	0,39	0,30	0,34	0,34	0,33	0,37	0,36	0,36
K (%)	2,56	2,75	2,38	2,66	2,66	1,97	2,37	1,92
Ca (%)	0,17	0,14	0,18	0,14	0,15	0,08	0,10	0,15
Mg (%)	0,16	0,17	0,16	0,15	0,16	0,12	0,13	0,16
S (%)	1,12	1,26	1,28	1,23	1,22	1,17	1,3	1,29
Na (%)	0,37	0,49	0,44	0,40	0,22	0,46	0,32	0,59
Fe (mg kg⁻¹)	62,34	58,76	35,64	42,62	35,70	35,71	24,97	40,19
Mn (mg kg⁻¹)	25,84	28,59	18,52	30,43	20,59	23,01	15,12	24,8
Zn (mg kg⁻¹)	31,52	27,46	24,50	26,43	26,96	25,96	22,39	24,31
Cu (mg kg⁻¹)	5,56	5,35	3,35	3,76	4,19	3,47	3,31	4,77
B (mg kg⁻¹)	46,58	35	34	33,28	37,88	30,48	25,27	38,03

Os resultados do **quadro 5** sugerem que a aplicação de bioestimulantes teve um efeito relevante na concentração de diversos nutrientes no material vegetal, tanto em condições de restrição hídrica (CRH) quanto sem restrição hídrica (SRH). Enuncia-se, então, alguns pontos chave:

- a) **Azoto (N):** A aplicação de bioestimulantes aumentou a concentração de N em ambas as condições hídricas. O tratamento BIO5xSRH apresentou o maior aumento (1,09%), comparado ao controlo SRH (0,58%).
- b) **Fósforo (P):** Houve uma variação na concentração de P, mas de modo geral, os bioestimulantes não mostraram uma diferença significativa em relação ao controlo.

- c) **Potássio (K):** Na modalidade CRH, a concentração de K foi maior no controlo (2,66%), tendo diminuído com o uso dos bioestimulantes. No entanto, na modalidade SRH, as variações foram menos pronunciadas.
- d) **Micronutrientes (Fe, Mn, Zn, Cu, B):** A aplicação de bioestimulantes resultou numa redução da concentração de ferro (Fe) em ambas as condições hídricas. Para o manganês (Mn) e zinco (Zn), houve uma redução significativa com a aplicação dos bioestimulantes, especialmente em CRH.

Para fundamentar estes resultados, diversos estudos confirmam o papel positivo do uso dos bioestimulantes na otimização da absorção de nutrientes e no auxílio da tolerância ao stress hídrico. Embora os bioestimulantes não apresentem um aumento expressivo nas concentrações de certos nutrientes, como o potássio, o fósforo e o zinco, no material vegetal, é importante considerar que as plantas tratadas com bioestimulantes apresentaram um crescimento significativamente superior em comparação com as plantas do controlo, tanto em condições de stress hídrico quanto em condições de conforto hídrico. Esse aumento no crescimento, visível em termos de área foliar, altura e biomassa final, sugere que as plantas com bioestimulantes conseguiram utilizar os nutrientes de uma forma mais eficiente para suportar um desenvolvimento superior. Assim, embora a concentração de nutrientes nas plantas tratadas com bioestimulantes tenha sido relativamente menor, isso pode ser atribuído à diluição causada pelo crescimento acelerado. Em contrapartida, o controlo, com crescimento menor, apresentou maior concentração de nutrientes, mas com menos quantidade de nutrientes disponíveis por unidade de área foliar.

Ademais, sabe-se que os microrganismos promotores de crescimento (PGPB) presentes da rizosfera ajudam na solubilização de nutrientes, como o fósforo, e na fixação de azoto, tornando-os mais disponíveis para a planta. Além disso, produzem fitohormonas que estimulam o crescimento das raízes, aumentando a absorção de nutrientes (Freitas *et al.*, 2022).

5. Conclusão

O presente estudo teve como primeiro objetivo, avaliar a eficácia dos bioestimulantes microbianos na indução da tolerância ao déficit hídrico na cultura do milho, um cultivo de grande relevância econômica e com elevadas necessidades hídricas. Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que a aplicação de bioestimulantes teve um efeito positivo e significativo tanto em condições hídricas favoráveis (SRH) quanto em condições de restrição hídrica (CRH).

Na fase inicial, foi possível identificar três bioestimulantes (Bio 2, Bio 5, e Bio 10) que se destacaram por promoverem um aumento significativo na biomassa das plantas em comparação com o controle. Esses bioestimulantes foram, então, selecionados para a fase subsequente do estudo, onde se realizou um acompanhamento mais detalhado das plantas, utilizando a fenotipagem digital de alto rendimento para monitorizar o desenvolvimento morfológico e fisiológico das plantas e, por fim, possibilitando analisar a eficácia do uso desta recente tecnologia; seguindo-se com as medições finais de biomassas

Os dados recolhidos mostraram que, em condições de déficit hídrico, as plantas tratadas com bioestimulantes apresentaram uma mitigação dos efeitos negativos do déficit hídrico, resultando num crescimento contínuo e, em alguns casos, comparável ao crescimento das plantas controle em condições hídricas favoráveis. Em particular, o bioestimulante Bio 5 demonstrou ser o mais eficaz, seguido pelos bioestimulantes Bio 10 e Bio 2. Aliás, os parâmetros fisiológicos medidos, como o índice de vegetação por diferença normalizada (NDVI) e os outros índices de pigmentos (NPCI, GLI), mostraram que as plantas tratadas com bioestimulantes mantêm uma maior eficiência fotossintética e um melhor estado de saúde geral, mesmo sob condições de restrição hídrica.

Através do estudo detalhado da evolução do crescimento das plantas, utilizando a fenotipagem digital de alto rendimento, foi possível observar que a aplicação de bioestimulantes em situações de déficit hídrico antecipou a reação das plantas ao stress. Este efeito é atribuído à capacidade dos bioestimulantes de ajudar as plantas a desenvolver mecanismos de resistência de forma mais rápida do que as plantas não tratadas. Esse fenómeno geralmente ocorre devido à ação dos microrganismos presentes nos bioestimulantes, que promovem a síntese de hormonas de crescimento e outros compostos benéficos, resultando numa resposta antecipada e crucial para a manutenção do crescimento e desenvolvimento das plantas em ambientes com disponibilidade hídrica limitada.

Associando-se às medidas finais realizadas, o uso da fenotipagem digital de alto rendimento provou ser uma ferramenta extremamente eficaz, permitindo uma monitorização precisa e contínua do crescimento das plantas. Este método forneceu dados quantitativos detalhados, permitindo não apenas confirmar a eficácia dos bioestimulantes em condições de stress hídrico, mas também acompanhar de forma minuciosa o desenvolvimento das plantas ao longo do tempo. Como tal, ofereceu vantagens significativas, uma vez que captou sinais no comportamento fisiológico das plantas que poderiam passar despercebidas através dos métodos convencionais. No entanto, a aplicação eficaz desta tecnologia exige uma formação especializada, visto que a interpretação dos metadados gerados demanda habilidades avançadas para manipular os grandes volumes de dados e extrair informações relevantes. Além disso, é necessário aprender a operar o software associado, que pode ser complexo, mas é fundamental para processar e analisar os resultados de forma precisa. Assim, a fenotipagem digital não só reforçou o valor dos bioestimulantes na agricultura moderna, como também exige uma capacitação técnica que permitirá aos profissionais do campo explorar plenamente o potencial dessa tecnologia inovadora.

Estudos como este, são particularmente relevantes no contexto das mudanças climáticas, onde a gestão eficiente dos recursos torna-se cada vez mais crucial e, especialmente diante do aumento nos custos dos fertilizantes tradicionais. O uso de bioestimulantes representa uma oportunidade significativa para reduzir a dependência de insumos químicos, ao promover uma maior eficiência no uso dos nutrientes, o que pode resultar numa melhor rentabilidade para os agricultores. Para convencer os produtores a adotarem esses produtos, é essencial demonstrar não apenas os benefícios agronómicos, como o maior crescimento e a resiliência das plantas, mas também os impactos económicos positivos, como a redução de custos e o retorno sustentável a longo prazo.

Como tal, continuam abertos vários caminhos para futuras investigações e inovações no uso de bioestimulantes microbianos na agricultura. Explorando consórcios microbianos, realizando análises moleculares e genómicas, monitorizando a eficácia a longo prazo, desenvolvendo novas formulações e tecnologias de aplicação, e integrando essas práticas com outras abordagens sustentáveis, será possível avançar significativamente na promoção da resiliência das culturas ao défice hídrico e na sustentabilidade da produção agrícola.

6. Referências bibliográficas

Agronegócios.eu (2020). Adaptação da cultura do milho às alterações climáticas. Acedido em janeiro 1, 2023, disponível em: <http://www.agronegocios.eu/noticias/adaptacao-da-cultura-do-milho-as-alteracoes-climaticas/>

Ahmad H.M., Fiaz S., Hafeez S., Zahra S., Shah A.N., Gul B., Aziz O., Mahmood-Ur-Rahman, Fakhar A., Rafique M., Chen Y., Yang S.H. & Wang X. (2022). *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Eliminate the Effect of Drought Stresse in Plants: A Review*. *Frontiers in Plant Science*.

Ali, S., & Khan, N. (2021). *Delineation of mechanistic approaches employed by plant growth promoting microorganisms for improving drought stresse tolerance in plants*. *Microbiological Research*.

Araus, J. L., Kefauver, S. C., Vergara-Díaz, O., Gracia-Romero, A., Rezzouk, F. Z., Segarra, J., Bort, J. (2022). *Crop phenotyping in a context of global change: What to measure and how to do it*. *Journal of Integrative Plant Biology*.

Azevedo, J.F.S. (2006). *Otimização da gestão de rega localizada em pereira 'Rocha' (Pyrus communis L.) com recurso a indicadores de teor de água no solo e a parâmetros fisiológicos* – Tese de Mestrado em Agricultura e Horticultura Sustentáveis. Instituto Superior de Agronomia – Universidade Técnica de Lisboa.

Bacon, M.A. (2004). *Water Use Efficiency in Plant Biology*. Oxford: Blackwell Publishing.

Barros, J. F. C., & Calado, J. G. (2014). *A Cultura do Milho*, 1–52.

Bashan, Y., de-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., & Hernandez, J. P. (2014). *Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013)*. *Plant and soil*, 378, 1-33.

Bergamaschi, H., Dalmago, G. A., Comiran, F., Bergonci, J. I., Müller, A. G., França, S., Santos, A. O., Radin, B., Bianchi, C. A. M., & Pereira, P. G. (2006). *Deficit hídrico e produtividade na cultura do milho*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*.

Blum, A. (2009). *Effective use of water (EUW) and not water-use efficiency (WUE) is the target of crop yield improvement under drought stress*. *Field Crops Research*.

Bose, B., et al., (2020) *Plant growth-promoting rhizobacteria in improving water stress resilience in plants: A review*. International Journal of Molecular Sciences.

Brito, C. H. De; Silveira, D. L.; Brandão, A. M.; Gomes, L. S.; Lopes, M. T.G. (2011). *Redução da área foliar do milho na região tropical do Brasil e os efeitos em caráter agrônomico*. Interciência, v. 36, p. 291-295.

Brito, M. E. B., Filho, G. D. de A., Wanderley, J. A. C., Melo, A. S. de, Costa, F. B. da, & Ferreira, M. G. P. (2013). *Growth, physiological and yield of sweet corn under water stress*. Bioscience Journal.

Bruce, W.B., Edmeades, G.O., Barker, T.C. (2002). *Molecular and physiological approaches to maize improvement for drought tolerance*. Journal of Experimental Botany.

Calvo, P., Nelson, L., & Kloepper, J. W. (2014). *Agricultural uses of plant biostimulants*. Plant and Soil.

Cellini, A., Sangiorgio, D., Donati, I., Pastore, C., Onofrietti, C., & Spinelli, F. (2020). *Facing climate change: Application of microbial biostimulants to mitigate stress in horticultural crops*. Agronomy.

Chaerle, L. (2007). *Multi-color fluorescence imaging for early detection of the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus*. Journal of Plant Physiology.

Chaves, M.M. Osório, J., Pereira, J.S. (2004). *Water use efficiency and photosynthesis*. Oxford: Blackwell Publishing, 42-74.

Colla, G.; Hoagland, L.; Ruzzi, M.; Cardarelli, M.; Bonini, P.; Canaguier, R.; Rouphael, Y. (2017) *Biostimulant Action of Protein Hydrolysates: Unraveling Their Effects on Plant Physiology and Microbiome*. In *Frontiers in Plant Science*.

Condon, A.G., Richards, R.A., Rebetzke, G.J., & Farquhar, G.D. (2004). *Breeding for high water-use efficiency*. Journal of Experimental Botany.

Cook, P.G., O'Grady, A.P. (2006). *Determining soil ground water use of vegetation from heat pulse, water potential and stable isotope data*. Oecologia, 148: 97-107.

Costa J.M., Marques da Silva J., Pinheiro C., Barón M., Mylona P., Centritto M., Haworth M., Loreto F., Uzilday B., Turkan I. e Oliveira MM. (2019) *Opportunities and Limitation of Crop Phenotyping in Southern European Countries*. In *Frontiers in Plant Science*.

Cruz, R.F.D. (2006). *Indução e Recuperação do Stresse Hídrico em Variedades Portuguesas de Milho* - Tese de Mestrado de Biologia do Stresse em Plantas. Universidade do Minho – Escola de Ciências.

De Diego, N. & Spíchal L., (2022) *Presence and future of plant phenotyping approaches in biostimulant research and development*. J. Exp. Botany.

Du Jardin, P. (2015) *Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation*. In Sci Hortic.

Egamberdieva, D., Wirth, S. J., Alqarawi, A. A., Abd_Allah, E. F., & Hashem, A. (2017). *Phytohormones and beneficial microbes: essential components for plants to balance stress and fitness*. Frontiers in microbiology, 8, 2104.

Eswaran, S. U. D., Sundaram, L., Perveen, K., Bukhari, N. A., & Sayyed, R. Z. (2024). *Osmolyte-producing microbial biostimulants regulate the growth of Arachis hypogaea L. under drought stress*. BMC Microbiology.

Fadiji, A. E., Babalola, O. O., Santoyo, G., & Perazzolli, M. (2022). *The Potential Role of Microbial Biostimulants in the Amelioration of Climate Change-Associated Abiotic Stresses on Crops*. Frontiers in Microbiology.

Farooq, M.; Wahid, A.; Kobayashi, N.; Fujita, D.; Basra, S. M. A. (2019) *Physiological and Biochemical Responses of Maize (Zea mays L.) to Drought Stress and Re-Watering*. In PLoS ONE.

Faust M. (1989). *Fruiting*. In: *Physiology of Temperature fruit Trees*. John Wiley & Sons, New York, 168-229.

Féret, L.; Francois, C.; Asner, G. P.; Gitelson, A.; Martin, R. E.; Bidet, L.L. (2011) *Estimating leaf chlorophyll content from reflectance spectra of leaves in tropical trees*. Remote Sensing of Environment.

Foyer, C. H., Siddique, K. H. M., Tai, A. P. K., Anders, S., Fodor, N., Wong, F. L., Ludidi, N., Chapman, M. A., Ferguson, B. J., Considine, M. J., Zabel, F., Prasad, P. V. V., Varshney, R. K., Nguyen, H. T., & Lam, H. M. (2019). *Modelling predicts that soybean is poised to dominate crop production across africa*. Plant Cell and Environment.

Franzoni, G., Cocetta, G., Prinsi, B., Ferrante, A., & Espen, L. (2022). *Biostimulants on Crops: Their Impact under Abiotic Stress Conditions*. Horticulturae.

- INE (2021). Relatório estatístico. INE, Instituto Nacional de Estatística.
- Jackson, J.E. (2003). *Water relations. In: Biology of horticultural crops. Biology of apples and pears.* Camb. Univ. Press, Cambridge, 485 pp.
- Kaiser, H., Kappen, L. (2001). *Stomatal oscillations at small apertures: indications for a fundamental insufficiency of stomatal feedback-control inherent in the stomatal turgor mechanism.* J. Exp. Bot., 52: 1303-1313
- Kaushal, P., Ali, N., Saini, S., Pati, P. K., Pati, A. M. (2023). *Physiological and molecular insight of microbial biostimulants for sustainable agriculture.* In Frontiers in Plant Science.
- Ladislav Bláha. (2019) *Importante of Root-Shoot Ratop for Crops Production.* Journal of Agronomy & Agricultural.
- Larher, F.R., Aziz, A., Gibon, Y., Trotel-Aziz, P., Sulpice, R., Bouchereau, A. (2004). *An assessment of the physiological properties of the so-called compatible solutes using in vitro experiments with leaf discs.* Plant Physiology and Biochemistry 41: 657-666.
- Li J, Van Gerrewey T., Geelen D. (2022) *A Meta-Analysis of Biostimulant Yield Effectiveness in Field Trials.* Frontiers in Plant Science.
- Lucini, L., Roupael, Y., Cardarelli, M., Canaguier, R., Kumar, P., & Colla, G. (2015). *The effect of a plant-derived biostimulant on metabolic profiling and crop performance of lettuce grown under saline conditions.* Scientia Horticulturae.
- Freitas, H., Ma, Y., Dias, M. C. (2022). *Strategies and prospects for biostimulants to alleviate abiotic stress in plants.* Frontiers in Plant Science.
- Mannino, G., et al. (2021). *Role of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria in the Mitigation of Salt Stress in Plants: A Review.* Journal of Plant Growth Regulation.
- Marro, M. (1981). *Técnicas de viticultura.* Editorial Presença, Lisboa.
- Martins, S. J., Rocha, G. A., de Melo, H. C., de Castro Georg, R., Ulhôa, C. J., de Campos Dianese, É., & Dunlap, C. A. (2018). *Plant-associated bacteria mitigate drought stress in soybean.* Environmental Science and Pollution Research.
- Mishra, K. B.; Iannacone, R.; Petrozza, A.; Mishra, A.; Armentano, N.; La Vecchia, G.; Trtílek, M.; Cellini, F.; Nedbal, L. (2012) *Engineered drought tolerance in tomato plants is reflected in chlorophyll fluorescence emission.* Frontiers in Plant Science.

Muazen, A. M. (2020) *Agricultural internet of things and decision support for precision smart farming*. New York: Editora Elsevier.

Nephali, L., Piater, L. A., Dubery, I. A., Patterson, V., Huyser, J., Burgess, K., & Tugizimana, F. (2020). *Biostimulants for plant growth and mitigation of abiotic stresses: A metabolomics perspective*. *Metabolites*, 10(12), 505.

Peripolli, M., Dornelles, S. H. B., Lopes, S. J., Tabaldi, L. A., Trivisiol, V. S., & Rubert, J. (2021). *Application of biostimulants in tomato subjected to water deficit: Physiological, enzymatic and production responses*. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*.

Phenospex (2022). *APPF creates a digital phenotype library to build machine Learning algorithms for plant stress identification*. Acedido em janeiro 9, 2023, disponível em: <https://phenospex.com/blog/appf-creates-a-digital-phenotype-library-to-build-machine-learning-algorithms-for-plant-stresse-identification/>

Prado, E.V., (2023). *Revista Gestão em Foco - Edição no 15 – Ano: 2023*. 101–110.

Qualfood (2022). *Bioestimulantes: o que são e como tornam a agricultura mais resiliente às alterações climáticas?* Acedido em janeiro 12, disponível em: <https://www.qualfood.com/noticias/item/3123-bioestimulantes-o-que-sao-e-como-tornam-a-agricultura-mais-resiliente-as-alteracoes-climaticas>

Rai, N., Rai, S. P., & Sarma, B. K. (2021). *Prospects for abiotic stress tolerance in crops utilizing phyto-and bio-stimulants*. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 754853.

Rosenzweig, C., & Tubiello, F. N. (2007). *Adaptation and mitigation strategies in agriculture: an analysis of potential synergies*. *Mitigation and adaptation strategies for global change*, 12, 855-873.

Rouphael, Y., & Colla, G. (2018) *Synergistic Biostimulatory Action: Designing the Next Generation of Plant Biostimulants for Sustainable Agriculture*. *Frontiers in Plant Science*.

Rouphael, Y., & Colla, G. (2020). *Biostimulants in agriculture*. *Frontiers in Plant Science*.

Rouphael, Y., Papa, S., Fusco, G. M., Ciriello, M., Formisano, L., Woo, S. L., De Pascale, S., & Carillo, P. (2022). *Microbial and Non-Microbial Biostimulants as Innovative Tools to Increase Macro and Trace Element Mineral Composition of Tomato and Spinach*. *Horticulturae*.

Santoyo, G., Guzmán-Guzmán, P., Parra-Cota, F. I., de los Santos-Villalobos, S., Orozco-Mosqueda, M. D. C., & Glick, B. R. (2021). *Plant growth stimulation by microbial consortia*. *Agronomy*.

Shaffique, S., Khan, M. A., Imran, M., Kang, S. M., Park, Y. S., Wani, S. H., & Lee, I. J. (2022). *Research Progress in the Field of Microbial Mitigation of Drought Stresse in Plants*. *Frontiers in Plant Science*.

Shahrajabian, M. H., Petropoulos, S. A., & Sun, W. (2023). *Survey of the Influences of Microbial Biostimulants on Horticultural Crops: Case Studies and Successful Paradigms*. *Horticulturae*.

Shukla, P. S., Mantin, E. G., Adil, M., Bajpai, S., Critchley, A. T., & Prithiviraj, B. (2019). *Ascophyllum nodosum-based biostimulants: Sustainable applications in agriculture for the stimulation of plant growth, stress tolerance, and disease management*. *Frontiers in plant science*, 10, 462648.

Smart, R.E. (1974). *Aspects of water relations of the grapevine (Vitis vinífera)*. *Am. J. Enol. Vitic.* 25(2): 84-91.

Taiz, L., Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology*, 3ª edição, Sinauer Associates, Inc.

Torres-Pereira, J.M. (1984). *Fisiologia vegetal*. Vila Real, U.T.A.D.

Tromp, J., A.D. Webster & S.J. Wertheim (2005). *Fundamentals of Temperature Zone Tree fruit Production*. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherland, 26-38 pp.

Walter A., Liebisch F. & Hund A. (2015) *Plant phenotyping: from bean weighing to image analysis*. *Plant Methods*.

Wang, F.; Liang, W.; Jia, H.; Jiang, J. (2020) *Impact of Drought Stress on Chlorophyll Content and Chlorophyll Fluorescence in Soybean*. *Frontiers in Plant Science*.

Yadav, A., & Yadav, K. (2018). *Survival of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)*. *Recent Advances in Microbiology*. Nova Science Publishers.

Yakhin O.I., Lubyaynov A.A., Yakhin I.A. & Brown P.H. (2017) *Biostimulants in Plant Science: A Global Perspective*. *Frontiers in Plant Science*.

Zhang, H., Kim, M. S., Sun, Y., Dowd, S. E., & Shi, H. (2020). *Bacterial mediation of plant salt tolerance*. *Frontiers in Plant Science*.

Zou, P.; Lu, X.; Zhao, H.; Yuan, Y.; Meng, L.; Zhang, C.; Li, Y. (2019) *Polysaccharides Derived from the Brown Algae Lessonia nigrescens Enhance Salt Stress Tolerance to Wheat Seedlings by Enhancing the Antioxidant System and Modulating Intracellular Ion*. *Frontiers in Plant Science*.

ANEXOS

Anexo I – Boletim da Análise do Solo



INSTITUTO POLITÉCNICO DE SANTARÉM
ESCOLA SUPERIOR AGRÁRIA DE SANTARÉM



Departamento de Ciências Agrárias e Ambiente
- Unidade Laboratorial -

ANÁLISE DE TERRA

DCAA - UL Estágio/aulas

Referência do Laboratório	Referência da Amostra	Entrada	Saída
626	Cristiana Carvalho - Milho	04/04/2023	19/4/2023

ANÁLISES		Resultados	Muito Baixo	Baixo	Médio	Alto	Muito Alto
X	Textura de Campo	Grosseira					
X	pH (H ₂ O)	7,2			Neutro		
X	Matéria Orgânica (%)	3,46				x	
X	Fósforo assimilável (mg.kg ⁻¹)	>500					x
X	Potássio assimilável (mg.kg ⁻¹)	297					x
X	Calcário Total (%)	0,00	Não Calcário				
	Calcário assimilável (mg.kg ⁻¹)						
	Magnésio assimilável (mg.kg ⁻¹)						
	Ferro extraível (mg.kg ⁻¹)						
	Cobre extraível (mg.kg ⁻¹)						
	Zinco extraível (mg.kg ⁻¹)						
	Manganês extraível (mg.kg ⁻¹)						
	Boro extraível (mg.kg ⁻¹)						
X	Azoto Total (%)	0,13	Comentários:				
	Azoto Nítrico (mg.kg ⁻¹)						
	Ca Troca (me/100 g)						
	Mg Troca (me/100 g)						
	K Troca (me/100 g)						
	Na Troca (me/100 g)						
	Acidez titulavel (me/100 g)						
	Soma Bases Troca (me/100 g)						
	Cap.Troca Catiónica (me/100 g)						
	Areia (%)						
	Limo (%)						
	Argila (%)						
	Classe de Textura						
	Cloretos (g/kg)						
	Calcário ativo (%)						
	Condutividade eléctrica(dS.m ⁻¹)						

Técnico:

Contato direto: Tel: 243 307 345

ul.dcaa@esa.ipsantarem.pt

Quinta do Galinheiro, S. Pedro - 2001-904 Santarém

Tel.: 243 307 300 - Fax: 243 307 301 - email: info@esa.ipsantarem.pt - URL: www.esa.ipsantarem.pt

Anexo II – Boletins das Análises de Material vegetal



INSTITUTO POLITÉCNICO DE SANTARÉM
Escola Superior Agrária de Santarém



Departamento de Ciências Agrárias e Ambiente

Unidade Laboratorial

BOLETIM DE ANÁLISES DE MATERIAL VEGETAL

Tipo de Amostra: MATERIAL VEGETAL **Cliente:** I&D
Referência do Laboratório: 442 **Subcliente:** Estágio Mestrado de Cristiana Carvalho - Drº Manuel A.
Referência da Amostra: ControloxSRH **Morada:**
Data entrada: 08/11/2023 **NIF:** -
Data saída: 01/03/2024 **Nº de cliente:** 6

Análises	Resultados	Nível do nutriente			Valores de referência
		insuficiente	suficiente	elevado	
N - Azoto (%)	0,58				
P - Fósforo (%)	0,39				
K - Potássio (%)	2,56				
Ca - Cálcio (%)	0,17				
Mg - Magnésio (%)	0,16				
S - Enxofre (%)	1,12				
Na - Sódio (%)	0,37				
Fe - Ferro (mg kg ⁻¹)	62,34				
Mn - Manganês (mg kg ⁻¹)	25,84				
Zn - Zinco (mg kg ⁻¹)	31,52				
Cu - Cobre (mg kg ⁻¹)	5,56				
B - Boro (mg kg ⁻¹)	46,58				

Nota: n.d. - não detetável

Técnico: _____ Responsável: _____

Departamento de Ciências Agrárias e Ambiente

Unidade Laboratorial

BOLETIM DE ANÁLISES DE MATERIAL VEGETAL

Tipo de Amostra:	MATERIAL VEGETAL	Cliente:	I&D
Referência do Laboratório:	BIO2xSRH	Subcliente:	Estágio Mestrado de Cristiana Carvalho - Drº Manuel A.
Referência da Amostra:		Morada:	
Data entrada:	08/11/2023	NIF:	-
Data saída:	01/03/2024	Nº de cliente:	6

Análises	Resultados	Nível do nutriente			Valores de referência
		insuficiente	suficiente	elevado	
N - Azoto (%)	1,02				
P - Fósforo (%)	0,30				
K - Potássio (%)	2,75				
Ca - Cálcio (%)	0,14				
Mg - Magnésio (%)	0,17				
S - Enxofre (%)	1,26				
Na - Sódio (%)	0,49				
Fe - Ferro (mg kg ⁻¹)	58,76				
Mn - Manganês (mg kg ⁻¹)	28,59				
Zn - Zinco (mg kg ⁻¹)	27,46				
Cu - Cobre (mg kg ⁻¹)	5,35				
B - Boro (mg kg ⁻¹)	35,00				
Nota: n.d. - não detetável					
Técnico:		Responsável:			

Departamento de Ciências Agrárias e Ambiente
Unidade Laboratorial

BOLETIM DE ANÁLISES DE MATERIAL VEGETAL

Tipo de Amostra: MATERIAL VEGETAL **Cliente:** I&D
Referência do Laboratório: 444 **Subcliente:** Estágio Mestrado de Cristiana Carvalho - Drº Manuel A.
Referência da Amostra: BIO10xSRH **Morada:**
Data entrada: 08/11/2023 **NIF:** -
Data saída: 01/03/2024 **Nº de cliente:** 6

Análises	Resultados	Nível do nutriente			Valores de referência
		insuficiente	suficiente	elevado	
N - Azoto (%)	0,88				
P - Fósforo (%)	0,34				
K - Potássio (%)	2,66				
Ca - Cálcio (%)	0,14				
Mg - Magnésio (%)	0,15				
S - Enxofre (%)	1,23				
Na - Sódio (%)	0,40				
Fe - Ferro (mg kg ⁻¹)	42,62				
Mn - Manganês (mg kg ⁻¹)	30,43				
Zn - Zinco (mg kg ⁻¹)	26,43				
Cu - Cobre (mg kg ⁻¹)	3,76				
B - Boro (mg kg ⁻¹)	33,28				

Nota: n.d. - não detetável

Técnico: _____ Responsável: _____

Departamento de Ciências Agrárias e Ambiente
Unidade Laboratorial

BOLETIM DE ANÁLISES DE MATERIAL VEGETAL

Tipo de Amostra: MATERIAL VEGETAL **Cliente:** I&D
Referência do Laboratório: 446 **Subcliente:** Estágio - Mestrado de Cristiana Carvalho - Drº Manuel A.
Referência da Amostra: BIOSxSRH **Morada:**
Data entrada: 08/11/2023 **NIF:** -
Data saída: 01/03/2024 **Nº de cliente:** 6

Análises	Resultados	Nível do nutriente			Valores de referência
		insuficiente	suficiente	elevado	
N - Azoto (%)	1,09				
P - Fósforo (%)	0,34				
K - Potássio (%)	2,38				
Ca - Cálcio (%)	0,18				
Mg - Magnésio (%)	0,16				
S - Enxofre (%)	1,28				
Na - Sódio (%)	0,44				
Fe - Ferro (mg kg ⁻¹)	35,64				
Mn - Manganês (mg kg ⁻¹)	18,52				
Zn - Zinco (mg kg ⁻¹)	24,50				
Cu - Cobre (mg kg ⁻¹)	3,35				
B - Boro (mg kg ⁻¹)	34,00				

Nota: n.d. - não detetável

Técnico: _____ Responsável: _____

Departamento de Ciências Agrárias e Ambiente
Unidade Laboratorial

BOLETIM DE ANÁLISES DE MATERIAL VEGETAL

Tipo de Amostra: MATERIAL VEGETAL **Cliente:** I&D
Referência do Laboratório: 447 **Subcliente:** Estágio Mestrado de Cristiana Carvalho - Drº Manuel A.
Referência da Amostra: ControloxCRH **Morada:**
Data entrada: 08/11/2023 **NIF:** -
Data saída: 01/03/2024 **Nº de cliente:** 6

Análises	Resultados	Nível do nutriente			Valores de referência
		insuficiente	suficiente	elevado	
N - Azoto (%)	0,81				
P - Fósforo (%)	0,33				
K - Potássio (%)	2,66				
Ca - Cálcio (%)	0,15				
Mg - Magnésio (%)	0,16				
S - Enxofre (%)	1,22				
Na - Sódio (%)	0,22				
Fe - Ferro (mg kg ⁻¹)	35,37				
Mn - Manganês (mg kg ⁻¹)	20,59				
Zn - Zinco (mg kg ⁻¹)	26,96				
Cu - Cobre (mg kg ⁻¹)	4,19				
B - Boro (mg kg ⁻¹)	37,88				

Nota: n.d. - não detetável

Técnico: _____ Responsável: _____

Departamento de Ciências Agrárias e Ambiente
Unidade Laboratorial

BOLETIM DE ANÁLISES DE MATERIAL VEGETAL

Tipo de Amostra: MATERIAL VEGETAL **Cliente:** I&D
Referência do Laboratório: 448 **Subcliente:** Estágio Mestrado de Cristiana Carvalho - Drº Manuel A.
Referência da Amostra: BIO2xCRH **Morada:**
Data entrada: 08/11/2023 **NIF:** -
Data saída: 01/03/2024 **Nº de cliente:** 6

Análises	Resultados	Nível do nutriente			Valores de referência
		insuficiente	suficiente	elevado	
N - Azoto (%)	0,95				
P - Fósforo (%)	0,37				
K - Potássio (%)	1,97				
Ca - Cálcio (%)	0,08				
Mg - Magnésio (%)	0,12				
S - Enxofre (%)	1,17				
Na - Sódio (%)	0,46				
Fe - Ferro (mg kg ⁻¹)	35,71				
Mn - Manganês (mg kg ⁻¹)	23,01				
Zn - Zinco (mg kg ⁻¹)	25,96				
Cu - Cobre (mg kg ⁻¹)	3,47				
B - Boro (mg kg ⁻¹)	30,48				

Nota: n.d. - não detetável

Técnico: _____ Responsável: _____

Departamento de Ciências Agrárias e Ambiente
Unidade Laboratorial

BOLETIM DE ANÁLISES DE MATERIAL VEGETAL

Tipo de Amostra: MATERIAL VEGETAL **Cliente:** I&D
Referência do Laboratório: 449 **Subcliente:** Estágio: Mestrado de Cristiana Carvalho - Drº Manuel Aदाixo
Referência da Amostra: BIO10xCRH **Morada:**
Data entrada: 08/11/2023 **NIF:** -
Data saída: 04/03/2024 **Nº de cliente:** 6

Análises	Resultados	Nível do nutriente			Valores de referência
		insuficiente	suficiente	elevado	
N - Azoto (%)	1,17				
P - Fósforo (%)	0,36				
K - Potássio (%)	1,92				
Ca - Cálcio (%)	0,15				
Mg - Magnésio (%)	0,16				
S - Enxofre (%)	1,29				
Na - Sódio (%)	0,59				
Fe - Ferro (mg kg ⁻¹)	40,19				
Mn - Manganês (mg kg ⁻¹)	24,80				
Zn - Zinco (mg kg ⁻¹)	24,31				
Cu - Cobre (mg kg ⁻¹)	4,77				
B - Boro (mg kg ⁻¹)	38,03				
Nota: n.d. - não detetável					
Técnico:		Responsável:			

Departamento de Ciências Agrárias e Ambiente
Unidade Laboratorial

BOLETIM DE ANÁLISES DE MATERIAL VEGETAL

Tipo de Amostra: MATERIAL VEGETAL **Cliente:** I&D
Referência do Laboratório: 451 **Subcliente:** Estágio Mestrado de Cristiana Carvalho - Dr.º Manuel A.
Referência da Amostra: BIOSxCRH **Morada:**
Data entrada: 08/11/2023 **NIF:** -
Data saída: 01/03/2024 **N.º de cliente:** 6

Análises	Resultados	Nível do nutriente			Valores de referência
		insuficiente	suficiente	elevado	
N - Azoto (%)	1,02				
P - Fósforo (%)	0,36				
K - Potássio (%)	2,37				
Ca - Cálcio (%)	0,10				
Mg - Magnésio (%)	0,13				
S - Enxofre (%)	1,30				
Na - Sódio (%)	0,32				
Fe - Ferro (mg kg ⁻¹)	24,97				
Mn - Manganês (mg kg ⁻¹)	15,12				
Zn - Zinco (mg kg ⁻¹)	22,39				
Cu - Cobre (mg kg ⁻¹)	3,31				
B - Boro (mg kg ⁻¹)	25,27				
Nota: n.d. - não detetável					
Técnico:		Responsável:			

ANEXO III – Registo Climático da FASE I

No quadro estão apresentadas as temperaturas máximas ao longo do ensaio da **FASE I**, assim como, o registo das humidades presentes no interior estufa.

DATA	Temperatura Máx. (°C)	Temperatura Mín. (°C)	Humidade Relativa (%)
25/05/2023 (0 DAS)	39,7	20,7	64,0
26/05/2023 (1 DAS)	36,9	18,8	63,9
27/05/2023 (2 DAS)	41,5	19,1	56,7
28/05/2023 (3 DAS)	44,6	17,0	51,4
29/05/2023 (4 DAS)	33,1	18,3	59,5
30/05/2023 (5 DAS)	35,7	19,3	60,6
31/05/2023 (6 DAS)	36,2	17,7	54,3
01/06/2023 (7 DAS)	38,7	16,0	45,6
02/06/2023 (8 DAS)	41,3	17,1	46,3
03/06/2023 (9 DAS)	41,6	17,7	45,2
04/06/2023 (10 DAS)	42,2	19,3	48,6
05/06/2023 (11 DAS)	40,6	18,1	59,3
06/06/2023 (12 DAS)	38,5	19,2	64,0
07/06/2023 (13 DAS)	39,1	17,4	63,9
08/06/2023 (14 DAS)	37,4	18,6	56,7
09/06/2023 (15 DAS)	38,2	17,2	51,4
10/06/2023 (16 DAS)	35,7	19,3	60,6
11/06/2023 (17 DAS)	36,2	17,7	54,3
12/06/2023 (18 DAS)	38,7	16,0	45,6
13/06/2023 (19 DAS)	41,3	17,1	45,3
14/06/2023 (20 DAS)	38,3	17,7	46,6

ANEXO IV – Registo Climático da FASE II

No quadro estão apresentadas as temperaturas máximas ao longo do ensaio da FASE II, assim como, o registo das humidades presentes no interior estufa.

DATA	Temperatura Máx. (°C)	Temperatura Mín. (°C)	Humidade Relativa (%)	DATA	Temperatura Máx. (°C)	Temperatura Mín. (°C)	Humidade Relativa (%)
01/09/2023 (0 DAS)	45,7	16	45,6	25/09/2023 (24 DAS)	49,6	17,7	41,2
02/09/2023 (1 DAS)	49,3	17,1	40,3	26/09/2023 (25 DAS)	42,2	19,3	45,6
03/09/2023 (2 DAS)	45,4	19,7	48,9	27/09/2023 (26 DAS)	40,6	18,1	59,3
04/09/2023 (3 DAS)	44,9	20,8	46,3	28/09/2023 (27 DAS)	38,9	19,3	56,1
05/09/2023 (4 DAS)	37,5	20,8	58,3	29/09/2023 (28 DAS)	39,3	17,3	55,6
06/09/2023 (5 DAS)	38,6	17,2	64	30/09/2023 (29 DAS)	37,8	18,6	53,9
07/09/2023 (6 DAS)	39,1	18,5	63,9	01/10/2023 (30 DAS)	41,7	19,4	54,3
08/09/2023 (7 DAS)	37,2	17,4	56,7	02/10/2023 (31 DAS)	39,5	16,9	45,6
09/09/2023 (8 DAS)	37,6	17,6	51,4	03/10/2023 (32 DAS)	38,4	17,8	46,2
10/09/2023 (9 DAS)	39,2	18,5	59,5	04/10/2023 (33 DAS)	36,3	18,8	56,8
11/09/2023 (10 DAS)	41,2	19,1	60,6	05/10/2023 (34 DAS)	37,8	19,6	58,3
12/09/2023 (11 DAS)	40,3	17,1	54,3	06/10/2023 (35 DAS)	39,3	18,1	56,3
13/09/2023 (12 DAS)	45,4	19,7	48,9	07/10/2023 (36 DAS)	40,9	19,5	61
14/09/2023 (13 DAS)	44,9	20,8	46,3	08/10/2023 (37 DAS)	41,3	18,8	60,4
15/09/2023 (14 DAS)	37,5	20,8	58,3	09/10/2023 (38 DAS)	39,3	18,5	50,4
16/09/2023 (15 DAS)	39,7	20,7	64	10/10/2023 (39 DAS)	38,2	18,8	53,8
17/09/2023 (16 DAS)	36,9	18,8	63,9	11/10/2023 (40 DAS)	36,5	18,3	61,3
18/09/2023 (17 DAS)	41,5	19,1	56,7	12/10/2023 (41 DAS)	39,1	17,5	50,8
19/09/2023 (18 DAS)	44,6	17	51,4	13/10/2023 (42 DAS)	33,2	17,2	61
20/09/2023 (19 DAS)	33,1	18,3	59,5	14/10/2023 (43 DAS)	31,5	18,7	65,2
21/09/2023 (20 DAS)	35,7	19,3	60,6	15/10/2023 (44 DAS)	29,8	18,5	57,8
22/09/2023 (21 DAS)	36,2	17,7	54,3	16/10/2023 (45 DAS)	32,5	20,5	58,3
23/09/2023 (22 DAS)	45,7	16	45,6	17/10/2023 (46 DAS)	31,2	20,9	62,4
24/09/2023 (23 DAS)	49,3	17,1	40,1	-	-	-	-

ANEXO V – Dados Estatísticos

Quadro 6 – Dados de significância da Análise de Variância (Two-way ANOVA) relativamente às variáveis dependentes: Peso Fresco e Peso Seco da Parte Aérea da FASE I experimental.

	Peso Fresco - Parte Aérea		Peso Seco - Parte Aérea	
	F	<i>p</i>	F	<i>p</i>
Tratamento	3,331	0,003	3,338	<0,001
Regime Hídrico	1734,143	<0,001	740,980	<0,001
Tratamento x Regime Hídrico	1,053	0,405	3,092	0,002

Quadro 7 - Dados de significância da Análise de Variância (repeated measurements ANOVA) relativamente às variáveis dependentes: Área Foliar e Altura das plantas da FASE II experimental.

	Área Foliar		Altura da Planta	
	F	<i>p</i>	F	<i>p</i>
Tempo	2970,311	<0,001	4058,995	<0,001
Tempo x Tratamento	8,188	<0,001	4,678	0,006
Tempo x Regime Hídrico	31,271	<0,001	137,303	<0,001
Tempo x Tratamento x Regime Hídrico	1,901	0,071	1,497	0,232
Tratamento	104,970	<0,001	34,113	<0,001
Regime Hídrico	230,402	<0,001	378,333	<0,001
Tratamento x Regime Hídrico	10,085	<0,001	1,651	0,204

Quadro 8 - Dados de significância da Análise de Variância (ANOVA repeated measurements) relativamente às variáveis dependentes: NDVI, NPCI e GLI da FASE II experimental.

	NDVI		NPCI		GLI	
	F	<i>p</i>	F	<i>p</i>	F	<i>p</i>
Tempo	28,704	<0,001	21,443	<0,001	25,661	<0,001
Tempo x Tratamento	2,601	0,011	1,756	0,116	2,012	0,044
Tempo x Regime Hídrico	41,422	<0,001	16,203	<0,001	18,229	<0,001
Tempo x Tratamento x Regime Hídrico	0,876	0,553	0,800	0,588	0,979	0,468
Tratamento	22,502	<0,001	11,887	<0,001	41,325	<0,001
Regime Hídrico	578,671	<0,001	279,350	<0,001	458,178	<0,001
Tratamento x Regime Hídrico	0,070	0,975	0,994	0,413	2,427	0,090

Quadro 9 - Dados de significância da Análise de Variância (Split Plot ANOVA) relativamente às variáveis dependentes: Diâmetro do Caule, Peso fresco da parte radicular e da parte aérea e Biomassa total da FASE II experimental.

	Diâmetro		Peso Fresco - Parte Radicular		Peso Fresco - Parte Aérea		Biomassa Total	
	F	<i>p</i>	F	<i>p</i>	F	<i>p</i>	F	<i>p</i>
Tratamento	100,469	<0,001	216,939	<0,001	44,841	<0,001	371,450	<0,001
Regime	28,725	0,002	316,416	<0,001	185,734	<0,001	1615,305	<0,001
Tratamento x Regime	2,366	0,105	5,582	0,007	0,498	0,688	7,783	0,002

Quadro 10 - Dados de significância da Análise de Variância (Split Plot ANOVA) relativamente às variáveis dependentes: *Root-Shoot*, Conteúdo de Água nas folhas e F_V/F_M das plantas da FASE II experimental.

	<i>Root-Shoot</i>		Conteúdo de Água nas folhas		F_V/F_M	
	F	<i>p</i>	F	<i>p</i>	F	<i>p</i>
Tratamento	3,962	0,025	13,639	<0,001	15,052	<0,001
Regime	480,200	<0,001	116,758	<0,001	416,515	<0,001
Tratamento x Regime	5,734	0,006	4,394	0,017	3,067	0,054