

Estratégias sustentáveis para o aumento da eficiência do uso da água e de azoto em tomate (*Solanum lycopersicum* L.).

Francisco Eduardo Silva Costa e Sá

Mestrado em Engenharia Agronómica

Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

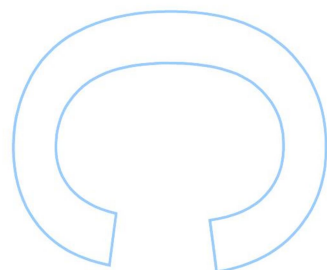
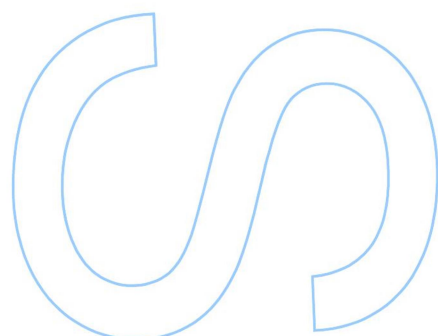
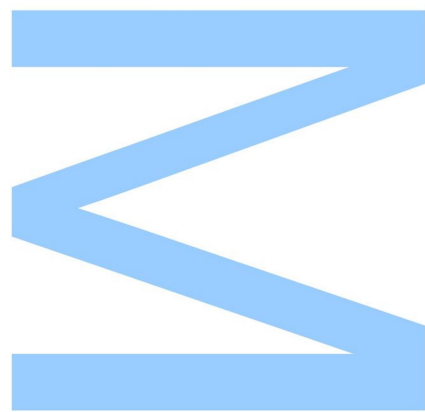
2021

Orientador

Profª. Doutora Susana Carvalho, Professor Auxiliar, Faculdade de Ciências da
Universidade do Porto

Supervisor

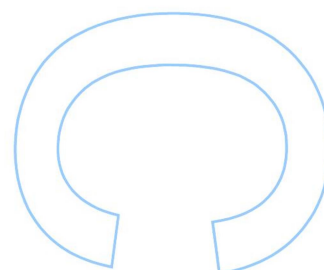
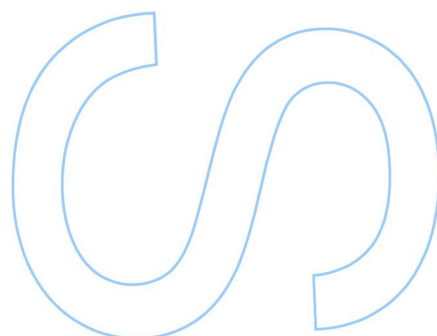
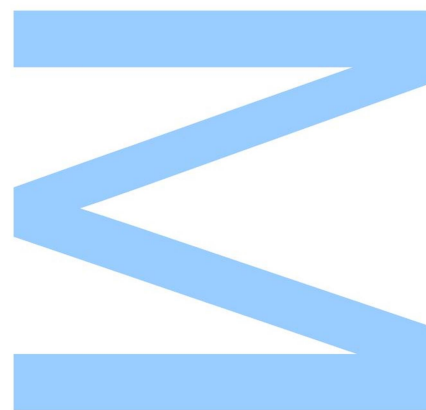
Joana Machado, Mestre, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto





Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.
O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

Gostaria de exprimir o maior dos agradecimentos a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a minha formação académica e pessoal.

Em primeiro lugar quero agradecer à Prof^a. Doutora Susana Carvalho, por se mostrar sempre prontamente disponível, por me auxiliar ao longo destes dois anos das mais variadíssimas formas e por me introduzir a uma grande equipa de trabalho, muito capaz e dotada. Agradeço com o mesmo carinho a toda a equipa, em particular à Mestre Joana Machado, uma das pessoas mais brilhantes que conheço e por quem levo como modelo a seguir, ao Mestre Miguel Santos, alguém bastante desenrascado, que ajuda sempre o próximo e que também sigo como modelo e à Mestre Patrícia Fernandes pela sua extraordinária dedicação e generosidade, e pelo seu grande coração.

À Faculdade de Ciências da Universidade do Porto pelo mestrado, pelos docentes, pelos funcionários, pelas instalações e pelo investimento nos alunos. À Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa por ter disponibilizado as suas instalações, em particular uma câmara climática, para a realização do 2º Ensaio.

À F.C.T. (Fundação para a Ciência e Tecnologia) pela bolsa disponibilizada no âmbito do projeto da *Summer School* do GreenUPorto “Verão com Ciência” e ao GreenUPorto como entidade de acolhimento para o curso de formação *Hands on Science for Sustainable AgriFood Production: From the Soil to the Fork*. Que contribuíram para iniciar o estudo realizado e para uma melhor formação académica.

À empresa Hubel® Verde (do grupo Hubel®), na pessoa do Eng. Tiago Moreira, pela disponibilização do BlueN® (Symborg S. L., Espanha).

Ao meu grande amigo Diogo Saraiva, que sempre me auxiliou e auxilia em todas as horas, sem pedir nada em troca. Um homem em um milhão, alguém com um carácter e simplicidade incomparáveis.

A todos os meus companheiros e professores que conheci no mestrado em Engenharia Agronómica, que de alguma forma me acompanharam, ajudaram e desafiaram nestes anos. São tantos e tão grandes!

E por último, mas mais importante à minha família. Aos meus irmãos João e Daniel e aos meus pais Rita e António, que sempre investiram e acreditaram em mim, que sempre lutaram e choraram por mim e comigo. Uma família que, nem por sombras, há igual!

A todos os meu sincero e eterno muito obrigado

Resumo

A necessidade de alimentar a população mundial em crescimento exponencial, tem levado a uma crescente necessidade de aumentar a produtividade agrícola. Sendo a água e o azoto dois dos principais recursos que afetam a produtividade das plantas, é frequente assistir-se a um uso excessivo dos mesmos acentuando dois dos maiores problemas associados à agricultura atual: a escassez de água e a poluição ambiental causada por fertilizantes. Deste modo, este estudo teve como objectivo avaliar duas estratégias sustentáveis capazes de aumentar a eficiência do uso água e de azoto numa cultura economicamente importante para o nosso país, o tomate (*Solanum lycopersicum* L.). A primeira estratégia consistiu na aplicação de um bioestimulante (BlueN®) composto pela bactéria fixadora de azoto atmosférico *Methylobacterium symbioticum*; e a segunda baseou-se na avaliação de dois genótipos, com eficiências distintas de resposta ao stress combinado de água e azoto, de forma a aferir as bases morfo-fisiológicas das plantas responsáveis pela tolerância a estes stresses. No que respeita à avaliação da eficácia da aplicação do BlueN® as plantas (cv. "Micro-Tom") foram submetidas a dois tratamentos: controlo e stress combinado de água e azoto. No que respeita à avaliação do comportamento dos genótipos contrastantes, as plantas foram submetidas a quatro tratamentos: controlo; stress hídrico (50%), stress de azoto (50%) e stress combinado de água e azoto. Os resultados obtidos demonstraram que a aplicação do BlueN® apenas resultou num aumento significativo do peso seco da raiz (27,6%) aquando do stress combinado, sugerindo que esta estratégia poderá ter potenciais benefícios após otimização do seu modo de aplicação, isto é, a frequência de aplicação (aplicação única), o "timing" ou a concentração de BlueN® fornecida às plantas poder não ter sido os ideais para se obterem resultados mais evidentes. Os resultados obtidos no ensaio dos genótipos contrastantes demonstraram que o stress de azoto teve um impacto mais elevado que o stress hídrico nos parâmetros peso seco do caule, número de folhas e teor de clorofila no genótipo não eficiente e peso seco da folha e área foliar no genótipo eficiente. Sendo portanto o stress de azoto o que mais influencia o stress combinado. Adicionalmente, verificou-se que o genótipo eficiente parece ter uma maior tolerância ao stress resultando num menor impacto ao nível dos parâmetros morfológicos (peso seco, área foliar, proporção folhas/planta, proporção parte aérea/raiz) e um maior teor de clorofilas aquando do stress de azoto. Os resultados deste trabalho sugerem que poderá ser possível melhorar a eficiência do uso de água e azoto, permitindo um

menor impacto ambiental e um maior rendimento através da implementação de estratégias sustentáveis como as aqui avaliadas.

Palavras-chave: bioestimulante, estratégias sustentáveis, stresses abióticos combinados, variação genotípica.

Abstract

The need to feed the exponentially growing world population has led to a growing need to increase agricultural productivity. As water and nitrogen are two of the main resources that affect plant productivity, it is common to see an excessive use of them, highlighting two of the biggest problems associated with today's agriculture: water scarcity and environmental pollution caused by fertilizers. Thus, this study aimed to evaluate two sustainable strategies capable of increasing the efficiency of water and nitrogen use in an economically important crop for our country, the tomato (*Solanum lycopersicum* L.). The first strategy consisted in the application of a biostimulant (BlueN®) composed of the atmospheric nitrogen-fixing bacteria *Methylobacterium symbioticum*; and the second was based on the evaluation of two genotypes, with different efficiencies of response to the combined stress of water and nitrogen, in order to assess the morphophysiological bases of plants responsible for tolerance to these stresses. Regarding the evaluation of the effectiveness of the application of BlueN®, the plants (cv. "Micro-Tom") were subjected to two treatments: control and combined stress of water and nitrogen. Regarding the evaluation of the behavior of contrasting genotypes, the plants were subjected to four treatments: control; water stress (50%), nitrogen stress (50%) and combined water and nitrogen stress. The results obtained showed that the application of BlueN® only resulted in a significant increase in root dry weight (27.6%) during combined stress, suggesting that this strategy may have potential benefits after optimizing its application mode, i.e., the frequency of application (single application), the "timing" or the concentration of BlueN® supplied to the plants may not have been ideal for obtaining more evident results. The results obtained in the contrasting genotype assay showed that nitrogen stress had a higher impact than water stress on the parameters stem dry weight, number of leaves and chlorophyll content in the inefficient genotype and fresh and dry leaf weight and area leaf in the efficient genotype. Therefore, nitrogen stress is the one that most influences the combined stress. Additionally, it was found that the efficient genotype seems to have a greater tolerance to stress resulting in a lower impact on morphological parameters (dry weight, leaf area, leaves/plant ratio, shoot/root ratio) and a higher chlorophyll content when in nitrogen stress. The results of this work suggest that it may be possible to improve the efficiency of the use of water and nitrogen, allowing a lower environmental impact and a higher yield through the implementation of sustainable strategies such as those evaluated here.

Keywords: biostimulant, sustainable strategies, combined abiotic stresses, genotypic variation.

Índice

Lista de figuras	IX
Lista de tabelas	XIII
Lista de equações	XIII
1. Introdução	14
1.1. Objetivos	15
2. Estado da arte	16
2.1. Alterações climáticas e a disponibilidade de água e azoto	16
2.2. Efeito do stress hídrico na planta	17
2.3. Azoto na planta	19
2.3.1. Stress de azoto na planta	20
2.4. Stress combinado	21
2.5. Tomate	23
2.5.1. “ <i>Solanum lycopersicum</i> ”	24
2.5.2. Cultura do tomate em Portugal e no mundo	25
2.5.4. Efeitos Morfo-fisiológicos do Stress Hídrico e de Azoto no Tomate	25
2.6. Estratégias sustentáveis para o aumento da eficiência do uso de água e azoto	29
2.6.1. Bioestimulantes	30
2.6.1.1. Inoculantes microbianos	30
2.6.1.2. BlueN®	31
2.6.2. Seleção de Genótipos Tolerantes	32
3. Material e métodos	36
3.1. Experiência 1: Efeito da aplicação do bioestimulante BlueN®	36
3.1.1. Desenho experimental e manutenção das plantas	36
3.1.2. Avaliação dos parâmetros morfológicos	38
3.1.3. Avaliação dos parâmetros fisiológicos	38
3.1.3.1. SPAD	38
3.1.3.2. Eficiência do uso de água	39
3.1.4. Análise estatística	39
3.2. Experiência 2: Efeito do stress combinado em genótipos contrastantes	39
3.2.1. Desenho experimental e manutenção das plantas	39
3.2.2. Avaliação dos parâmetros morfológicos	40
3.2.3. Avaliação dos parâmetros fisiológicos	41

3.2.3.1. SPAD	41
3.2.3.2. Eficiência do Uso da água.....	41
3.2.4. Análise estatística.....	41
4. Resultados e discussão.....	42
4.1. Efeitos da aplicação do BlueN® nas respostas da planta	42
4.1.1. Parâmetros morfológicos.....	42
4.1.2. Parâmetros fisiológicos	52
4.1.2.1. SPAD	52
4.1.2.2. Eficiência do uso de água	53
4.2. Avaliação da resposta de genótipos contrastantes de tomate ao stress hídrico e de azoto	55
4.2.1. Parâmetros morfológicos.....	55
4.2.3. Parâmetros fisiológicos	68
4.2.3.1 SPAD	68
4.2.3.2 Eficiência do Uso de água.....	69
5. Conclusão e Perspetivas Futuras	72
6. Referências.....	74

Lista de figuras

- Figura 1. Resposta das plantas ao stress hídrico de acordo com severidade do stress. Adaptado de Pimentel (2004)..... 18
- Figura 2. Produção das principais culturas hortícolas em Portugal, entre 2015 e 2017. Retirado de INE (2018). 25
- Figura 3. Respostas morfo-fisiológicas nos diferentes órgãos do tomateiro face ao stress hídrico, de azoto e do combinado de ambos. 29
- Figura 4. Esquema exemplificativo da forma de atuação do bioestimulante BlueN® na planta. Retirado de Symborg (2020). 32
- Figura 5. Diferentes tratamentos utilizados: controlo com BlueN® (100% azoto e 100% de capacidade de campo, com BlueN®), controlo sem BlueN® (100% azoto e 100% de capacidade de campo, sem BlueN®), stress combinado com BlueN® (50% azoto e 50% de capacidade de campo, com BlueN®), e stress combinado sem BlueN® (50% azoto e 50% de capacidade de campo, sem BlueN®). 37
- Figura 6. Descrição esquemática dos quatro tratamentos aplicados a cada genótipo em estudo: 100% de azoto e 100% capacidade de campo (controlo/verde); 100% de azoto e 50% de água (stress hídrico/azul); 50% de azoto e 100% capacidade de campo (stress azoto/vermelho); 50% de azoto e 50% capacidade de campo (stress combinado/amarelo)..... 40
- Figura 7. Peso seco total (A), das folhas (B), caule (C) e raiz (D) dos tomateiros para os tratamentos com 100% de azoto e 100% capacidade de campo (controlo) e 50% de azoto e 50% capacidade de campo (stress combinado), com e sem BlueN®. Os valores representados correspondem à média de doze réplicas e as barras o respetivo erro padrão. Estando marcados com n.s. os tratamentos que não registaram significância entre si e com * os que têm diferenças significativas ($p \leq 0,05$). A análise estatística dos dois tratamentos foi feita de forma independente. 44
- Figura 8. Comprimento da raiz (A) e altura (B) dos tomateiros para os tratamentos com 100% de azoto e 100% capacidade de campo (controlo) e 50% de azoto e 50% capacidade de campo (stress combinado), com e sem BlueN®. Os valores representados correspondem à média de doze réplicas e as barras o respetivo erro padrão. Estando marcados com n.s. os tratamentos que não registaram significância entre si e com * os que têm diferenças significativas ($p \leq 0,05$). A análise estatística dos dois tratamentos foi feita de forma independente. 46
- Figura 9. Número de folhas dos tomateiros para os tratamentos com 100% de azoto e 100% capacidade de campo (controlo) e 50% de azoto e 50% capacidade de campo (stress combinado), com e sem BlueN®. Os valores representados correspondem à média de doze réplicas e as barras o respetivo erro padrão. Estando marcados com n.s. os tratamentos que não registaram significância entre si e com * os que têm diferenças significativas ($p \leq 0,05$). A análise estatística dos dois tratamentos foi feita de forma independente..... 47
- Figura 10. Área foliar dos tomateiros para os tratamentos com 100% de azoto e 100% capacidade de campo (controlo) e 50% de azoto e 50% capacidade de campo (stress combinado), com e sem BlueN®. Os valores representados correspondem à média de doze réplicas e as barras o respetivo erro padrão. Estando marcados

com n.s. os tratamentos que não registaram significância entre si e com * os que têm diferenças significativas ($p \leq 0,05$). A análise estatística dos dois tratamentos foi feita de forma independente. 48

Figura 11. Proporção do peso seco entre folhas e planta dos tomateiros para os tratamentos com 100% de azoto e 100% capacidade de campo (controlo) e 50% de azoto e 50% capacidade de campo (stress combinado), com e sem BlueN®. Os valores representados correspondem à média de doze réplicas e as barras o respetivo erro padrão. Estando marcados com n.s. os tratamentos que não registaram significância entre si e com * os que têm diferenças significativas ($p \leq 0,05$). A análise estatística dos dois tratamentos foi feita de forma independente. 49

Figura 12. Proporção do peso seco entre parte aérea e raiz dos tomateiros para os tratamentos com 100% de azoto e 100% capacidade de campo (controlo) e 50% de azoto e 50% capacidade de campo (stress combinado), com e sem BlueN®. Os valores representados correspondem à média de doze réplicas e as barras o respetivo erro padrão. Estando marcados com n.s. os tratamentos que não registaram significância entre si e com * os que têm diferenças significativas ($p \leq 0,05$). A análise estatística dos dois tratamentos foi feita de forma independente. 50

Figura 13. Área foliar específica dos tomateiros para os tratamentos com 100% de azoto e 100% capacidade de campo (controlo) e 50% de azoto e 50% capacidade de campo (stress combinado), com e sem BlueN®. Os valores representados correspondem à média de doze réplicas e as barras o respetivo erro padrão. Estando marcados com n.s. os tratamentos que não registaram significância entre si e com * os que têm diferenças significativas ($p \leq 0,05$). A análise estatística dos dois tratamentos foi feita de forma independente. 51

Figura 14. Proporção de área foliar pelo peso seco dos tomateiros para os tratamentos com 100% de azoto e 100% capacidade de campo (controlo) e 50% de azoto e 50% capacidade de campo (stress combinado), com e sem BlueN®. Os valores representados correspondem à média de doze réplicas e as barras o respetivo erro padrão. Estando marcados com n.s. os tratamentos que não registaram significância entre si e com * os que têm diferenças significativas ($p \leq 0,05$). A análise estatística dos dois tratamentos foi feita de forma independente. 52

Figura 15. Teor de clorofila (SPAD) das folhas dos tomateiros para os tratamentos com 100% de azoto e 100% capacidade de campo (controlo) e 50% de azoto e 50% capacidade de campo (stress combinado), com e sem BlueN®. Os valores representados correspondem à média de doze réplicas e as barras o respetivo erro padrão. Estando marcados com n.s. os tratamentos que não registaram significância entre si e com * os que têm diferenças significativas ($p \leq 0,05$). A análise estatística dos dois tratamentos foi feita de forma independente. 53

Figura 16. Eficiência do uso de água dos tomateiros para os tratamentos com 100% de azoto e 100% capacidade de campo (controlo) e 50% de azoto e 50% capacidade de campo (stress combinado), com e sem BlueN®. Os valores representados correspondem à média de doze réplicas e as barras o respetivo erro padrão. Estando marcados com n.s. os tratamentos que não registaram significância entre

- si e com * os que têm diferenças significativas ($p \leq 0,05$). A análise estatística dos dois tratamentos foi feita de forma independente. 54
- Figura 17. Consumo de água em função da área foliar dos tomateiros para os tratamentos com 100% de azoto e 100% capacidade de campo (controlo) e 50% de azoto e 50% capacidade de campo (stress combinado), com e sem BlueN®. Os valores representados correspondem à média de doze réplicas e as barras o respetivo erro padrão. Estando marcados com n.s. os tratamentos que não registaram significância entre si e com * os que têm diferenças significativas ($p \leq 0,05$). A análise estatística dos dois tratamentos foi feita de forma independente. 54
- Figura 18. Peso seco total (A), da raiz (B), caule (C) e raiz (D) dos tomateiros para os tratamentos com 100% de azoto e 100% capacidade de campo (controlo/verde), 50% de azoto e 100% capacidade de campo (stress azoto/vermelho), 100% de azoto e 50% de capacidade de campo (stress hídrico/azul) 50% de azoto e 50% capacidade de campo (stress combinado/amarelo), para o genótipo eficiente e não eficiente. Os valores representados correspondem à média de seis réplicas e as barras o respetivo erro padrão. Letras diferentes são estatisticamente significativas a $p \leq 0,05$. Estando marcadas com n.s. as barras que não registaram significância entre os mesmos tratamentos, de genótipos diferentes, e com * as que têm diferenças significativas. 58
- Figura 19. Comprimento da raiz (A) e altura (B) dos tomateiros para os tratamentos controlo (100% de azoto e 100% capacidade de campo; verde), stress de azoto (50% de azoto e 100% capacidade de campo; vermelho), stress hídrico (100% de azoto e 50% capacidade de campo; azul) e stress combinado (50% de azoto e 50% capacidade de campo; amarelo), para o genótipo eficiente e não eficiente. Os valores representados correspondem à média de seis réplicas e as barras o respetivo erro padrão. Letras diferentes são estatisticamente significativas a $p \leq 0,05$. Estando marcadas com n.s. as barras que não registaram significância entre os mesmos tratamentos, de genótipos diferentes, e com * as que têm diferenças significativas. 61
- Figura 20. Número de folhas dos tomateiros para os tratamentos com 100% de azoto e 100% capacidade de campo (controlo/verde), 50% de azoto e 100% capacidade de campo (stress azoto/vermelho), 100% de azoto e 50% de capacidade de campo (stress hídrico /azul) 50% de azoto e 50% capacidade de campo (stress combinado/amarelo), para o genótipo eficiente e não eficiente. Os valores representados correspondem à média de seis réplicas e as barras o respetivo erro padrão. Letras diferentes são estatisticamente significativas a $p \leq 0,05$ Estando marcadas com n.s. as barras que não registaram significância entre os mesmos tratamentos, de genótipos diferentes, e com * as que têm diferenças significativas. 62
- Figura 21. Área foliar dos tomateiros para os tratamentos com 100% de azoto e 100% capacidade de campo (controlo/verde), 50% de azoto e 100% capacidade de campo (stress azoto/vermelho), 100% de azoto e 50% de capacidade de campo (stress hídrico/azul) 50% de azoto e 50% capacidade de campo (stress combinado/amarelo), para o genótipo eficiente e não eficiente. Os valores representados correspondem à média de seis réplicas e as barras o respetivo erro

padrão. Letras diferentes são estatisticamente significativas a $p \leq 0,05$. Estando marcadas com n.s. as barras que não registaram significância entre os mesmos tratamentos, de genótipos diferentes, e com * as que têm diferenças significativas.

- 63
- Figura 22. Proporção de peso seco entre folhas e planta dos tomateiros para os tratamentos com 100% de azoto e 100% capacidade de campo (controlo/verde), 50% de azoto e 100% capacidade de campo (stress azoto/vermelho), 100% de azoto e 50% de capacidade de campo (stress hídrico/azul) 50% de azoto e 50% capacidade de campo (stress combinado/amarelo), para o genótipo eficiente e não eficiente. Os valores representados correspondem à média de seis réplicas e as barras o respetivo erro padrão. Letras diferentes são estatisticamente significativas a $p \leq 0,05$. Estando marcadas com n.s. as barras que não registaram significância entre os mesmos tratamentos, de genótipos diferentes, e com * as que têm diferenças significativas. 64
- Figura 23. Proporção de peso seco entre parte aérea e raiz dos tomateiros para os tratamentos com 100% de azoto e 100% capacidade de campo (controlo/verde), 50% de azoto e 100% capacidade de campo (stress azoto/vermelho), 100% de azoto e 50% de capacidade de campo (stress hídrico/azul) 50% de azoto e 50% capacidade de campo (stress combinado/amarelo), para o genótipo eficiente e não eficiente. Os valores representados correspondem à média de seis réplicas e as barras o respetivo erro padrão. Letras diferentes são estatisticamente significativas a $p \leq 0,05$. Estando marcadas com n.s. as barras que não registaram significância entre os mesmos tratamentos, de genótipos diferentes, e com * as que têm diferenças significativas. 66
- Figura 24. Área foliar específica dos tomateiros para os tratamentos com 100% de azoto e 100% capacidade de campo (controlo/verde), 50% de azoto e 100% capacidade de campo (stress azoto/vermelho), 100% de azoto e 50% de capacidade de campo (stress hídrico/azul) 50% de azoto e 50% capacidade de campo (stress combinado/amarelo), para o genótipo eficiente e não eficiente. Os valores representados correspondem à média de seis réplicas e as barras o respetivo erro padrão. Letras diferentes são estatisticamente significativas a $p \leq 0,05$. Estando marcadas com n.s. as barras que não registaram significância entre os mesmos tratamentos, de genótipos diferentes, e com * as que têm diferenças significativas. 67
- Figura 25. Proporção de área foliar pelo peso seco dos tomateiros para os tratamentos com 100% de azoto e 100% capacidade de campo (controlo/verde), 50% de azoto e 100% capacidade de campo (stress azoto/vermelho), 100% de azoto e 50% de capacidade de campo (stress hídrico/azul) 50% de azoto e 50% capacidade de campo (stress combinado/amarelo), para o genótipo eficiente e não eficiente. Os valores representados correspondem à média de seis réplicas e as barras o respetivo erro padrão. Letras diferentes são estatisticamente significativas a $p \leq 0,05$. Estando marcadas com n.s. as barras que não registaram significância entre os mesmos tratamentos, de genótipos diferentes, e com * as que têm diferenças significativas. 68
- Figura 26. Teor de clorofila (SPAD) dos tomateiros para os tratamentos com 100% de azoto e 100% capacidade de campo (controlo/verde), 50% de azoto e 100%

capacidade de campo (stress azoto/vermelho), 100% de azoto e 50% de capacidade de campo (stress hídrico/azul) 50% de azoto e 50% capacidade de campo (stress combinado/amarelo), para o genótipo eficiente e não eficiente. Os valores representados correspondem à média de seis réplicas e as barras o respetivo erro padrão. Letras diferentes são estatisticamente significativas a $p \leq 0,05$. Estando marcadas com n.s. as barras que não registaram significância entre os mesmos tratamentos, de genótipos diferentes, e com * as que têm diferenças significativas. 69

Figura 27. Eficiência no uso de água dos tomateiros para os tratamentos com 100% de azoto e 100% capacidade de campo (controlo/verde), 50% de azoto e 100% capacidade de campo (stress azoto/vermelho), 100% de azoto e 50% de capacidade de campo (stress hídrico/azul) 50% de azoto e 50% capacidade de campo (stress combinado/amarelo), para o genótipo eficiente e não eficiente. Os valores representados correspondem à média de seis réplicas e as barras o respetivo erro padrão. Letras diferentes são estatisticamente significativas a $p \leq 0,05$. Estando marcadas com n.s. as barras que não registaram significância entre os mesmos tratamentos, de genótipos diferentes, e com * as que têm diferenças significativas. A análise estatística dos dois genótipos foi feita de forma independente. 70

Figura 28. Razão entre consumo de água e área foliar dos tomateiros para os tratamentos com 100% de azoto e 100% capacidade de campo (controlo/verde), 50% de azoto e 100% capacidade de campo (stress azoto/vermelho), 100% de azoto e 50% de capacidade de campo (stress hídrico/azul) 50% de azoto e 50% capacidade de campo (stress combinado/amarelo), para o genótipo eficiente e não eficiente. Os valores representados correspondem à média de seis réplicas e as barras o respetivo erro padrão. Letras diferentes são estatisticamente significativas a $p \leq 0,05$. Estando marcadas com n.s. as barras que não registaram significância entre os mesmos tratamentos, de genótipos diferentes, e com * as que têm diferenças significativas. 71

Lista de tabelas

Tabela 1. Mecanismos morfo-fisiológicos de tolerância ao stress hídrico e de azoto... 35

Lista de equações

Equação 1. Estimativa quantitativa percentual do stress de azoto na cultura (Greenwood, 1976).....	20
Equação 2. Proporção da parte aérea em relação à raiz.	38
Equação 3. Área foliar específica.	38
Equação 4. Proporção do peso da folha em relação à planta.	38
Equação 5. Proporção área foliar.	38
Equação 6. Eficiência do uso de água.....	39

Equação 7. Consumo de água por área foliar.....	39
---	----

1. Introdução

O crescimento exponencial da população mundial, aliado aos recursos alimentares limitados, irá agravar o problema existente de uma maior procura de alimentos e escassez na sua resposta (Godfray *et al.* (2010). Assim, a crescente necessidade de produzir mais alimentos e maximizar a produtividade das culturas tem vindo a aumentar o uso de fertilizantes azotados (Fernandes *et al.*, 2021; Liang *et al.*, 2019). Paralelamente, 80% da água doce disponível é utilizada na agricultura, o que torna este sector numa das maiores fontes de consumo deste recurso (Elbehri, 2015; Fernandes *et al.*, 2021). Este uso exacerbado de recursos tem graves implicações ambientais, como o aumento da emissão de gases com efeito de estufa, a erosão e a acidificação e salinização dos solos, com consequente contaminação de águas superficiais e subterrâneas, que são um fator extremamente limitante em várias produções (Figueira, 2007). Assim, é de extrema urgência investigar estratégias sustentáveis capazes de aumentar a eficiência do uso água e de azoto em culturas economicamente importantes, como o tomate, que além de ser um dos legumes mais consumidos no mundo, é também bastante sensível ao défice de água e de azoto (Du *et al.*, 2018).

Várias estratégias têm sido investigadas e sugeridas como opções promissoras para melhorar o uso destes recursos (Fernandes *et al.*, 2021). Uma das potenciais estratégias consiste na identificação de genótipos mais adaptados a níveis inferiores de água e azoto, que deverão ser estudados de modo a obter características bioquímicas e moleculares capazes de conferirem tolerância a estes stresses e que poderão posteriormente ser usados em programas de melhoramento (Bharadwaj, 2016). Outra estratégia advém do uso de bioestimulantes, que são produtos ou substâncias que estimulam processos naturais das plantas, como a absorção de nutrientes e a tolerância a stresses bióticos e abióticos. O uso dos mesmos pode preparar a planta atempadamente, fazendo-a responder mais prontamente e eficientemente ao stress causado, por exemplo, pela escassez de água e azoto, sendo uma estratégia mais ecológica do que apenas a fertilização convencional (Zandonadi, 2018). Apesar da existência de estudos que se prendam com o uso destas estratégias na resposta das plantas a stresses individuais, no que respeita a stresses combinados a informação é bastante limitada (Arora *et al.*, 2001; Sousa, 2019).

1.1. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho é analisar estratégias sustentáveis para o aumento da eficácia do uso da água e do azoto em tomate, permitindo uma maior poupança, um menor impacto no meio ambiente e um maior rendimento nas suas produções. Como objectivos específicos pretendeu-se: (i) avaliar a eficácia de um bioestimulante comercial (BlueN®) em tomate exposto ao stress combinado de água e azoto; (ii) estudar os mecanismos morfo-fisiológicos de genótipos contrastantes de tomateiro responsáveis pela sua maior adaptabilidade aos stresses hídricos, de azoto, e ao stress combinado,

Numa primeira etapa pretendeu-se avaliar o desempenho de um bioestimulante comercial (Blue N®, Symborg S.L., Espanha; cujo ingrediente ativo é a bactéria fixadora de azoto atmosférico *Methylobacterium Symbioticum*), como forma de aferir a sua potencial aplicação como estratégia sustentável na redução do uso de azoto e água em plantas de tomate (cv. “Micro-Tom” (*Solanum Lycopersicum* L.) submetidas a stress combinado de água e azoto. Deste modo, pretendeu-se avaliar o seu efeito em vários parâmetros morfológicos (i.e. comprimento da raiz e da parte aérea, peso seco da raiz, do caule e das folhas, nº de folhas, área foliar, peso seco total, proporção do peso seco entre folha e planta e entre a parte aérea e raiz, área foliar específica e proporção de área foliar das plantas) e fisiológicos (i.e. índice SPAD, consumo de água e eficiência do uso de água pelas plantas e consumo de água em função da área foliar). Posteriormente, pretendeu-se comparar a resposta de dois genótipos com comportamentos contrastantes no que respeita à sua eficiência de absorção e uso de água e azoto e identificar os diferentes parâmetros morfológicos e fisiológicos responsáveis por esta resposta adaptativa aquando da sua exposição a stress hídrico, de azoto e combinado de água e azoto. Para isso, pretendeu-se avaliar vários parâmetros morfológicos (i.e. comprimento da raiz e da parte aérea, peso seco da raiz, do caule e das folhas, nº de folhas, área foliar, peso seco total, proporção do peso seco entre folha e planta e entre a parte aérea e raiz, área foliar específica e proporção de área foliar das plantas) e fisiológicos (i.e. índice SPAD, consumo de água e eficiência do uso de água pelas plantas e consumo de água em função da área foliar) de forma a inferir a sua importância quer na resposta diferencial dos genótipos aos diferentes stresses (individuais ou combinado), quer de forma a perceber o contributo dos stresses individuais nas respostas observadas após exposição ao stress combinado.

2. Estado da arte

2.1. Alterações climáticas e a disponibilidade de água e azoto

As Nações Unidas alertam para um cenário onde a produção agrícola terá de aumentar 70%, com a humanidade a chegar aos 9,7 mil milhões de indivíduos em 2050, e a aumentar para o dobro ou o triplo em 2100, onde se esperam 11,2 mil milhões de pessoas no planeta. Posto isto, é importante realçar que a agricultura é a atividade que mais terra explora, sendo responsável pelo cultivo de 1,2 a 1,5 mil milhões de hectares e pelo pasto de 3,5 mil milhões de hectares (Howden *et al.*, 2007). No entanto, a maioria das terras cultiváveis tem rendimentos muito abaixo do seu potencial máximo e a atual trajetória global de expansão agrícola tem sérias implicações a longo prazo para o meio ambiente, como a perda de biodiversidade, a poluição e escassez de água e a emissão de gases com efeito de estufa (Crist *et al.*, 2017; Fernandes *et al.*, 2021; Tilman *et al.*, 2011).

A luta pelos recursos naturais e a redução do impacto ambiental das atividades humanas, neste caso da agricultura, é questionada por muitos, que acreditam que os dois objetivos são cada vez mais incompatíveis (Crist *et al.*, 2017). Paralelamente, as mudanças climáticas estão a tornar cada vez mais frequentes períodos extremos como a seca e as inundações (Fernandes *et al.*, 2021). Além disso, mais de 80% da água doce disponível é usada na agricultura, que é totalmente dependente deste recurso sobretudo para irrigação, tornando-o cada vez mais escasso e de baixa qualidade (Braga & Lima, 2014). Além disso, os fertilizantes azotados têm promovido o desenvolvimento económico e possibilitado uma maior segurança alimentar, estando mais de metade da população mundial dependente de plantas cultivadas com recurso aos mesmos (Fernandes *et al.*, 2021; Zhang, 2017). Por garantir um retorno económico, os produtores vêm-se compelidos a aumentar o uso dos fertilizantes azotados, aumentando a produtividade das suas culturas (Liang *et al.*, 2019). Contudo, apesar do papel importante destes fertilizantes na nutrição vegetal, o seu uso excessivo e a sua elevada mobilidade estão a traduzir-se em problemas na saúde humana, principalmente associadas a elevados níveis de nitrato na água de consumo (como a doença infantil metemoglobinemia ou “doença azul”, e potencialmente o cancro gástrico); em distúrbios na sanidade animal, especialmente nos ruminantes devido às forragens; e em graves problemas ambientais como a eutrofização da água, a libertação de gases como a amónia (NH_3) e o N_2O , este último como gás de estufa e

destruidor da camada de ozono (cerca de 70% das emissões de N_2O proveniente de atividades antropogénicas provêm da fertilização azotada), ou pela formação de chuvas ácidas (Rodrigues & Coutinho, 2000). De acordo com (Arrobas & Rodrigues, 2009) o azoto é, de entre todos os elementos nutrientes, o de gestão mais difícil e o que tem envolvido maior esforço da comunidade científica internacional.

Deste modo, é imperativo o apostar num aumento da tolerância ao stress hídrico e de N, em culturas como o tomate, para uma produção sustentável e ecologicamente correta (Machado *et al.*, 2021). O conhecimento das respostas morfo-fisiológicas à seca e ao stress de N é essencial para uma percepção holística dos mecanismos de tolerância das plantas a estes stresses.

2.2. Efeito do stress hídrico na planta

Belhassen (1997) definiu que stress hídrico é um conjunto de circunstâncias em que a planta sofre redução no crescimento ou rendimento, por causa do abastecimento insuficiente de água, ou por causa de um défice de humidade elevado. O crescimento vegetativo/celular é particularmente afetado pela turgidez dos tecidos, que é negativamente impactada pelo défice de água. Além disso, todo o padrão de crescimento sofre com o stress hídrico: a proporção raiz/parte aérea é aumentada; a espessura das paredes celulares, a cutinização e a lenhificação são aumentadas; a área foliar é reduzida, mas a espessura da folha é aumentada; ocorre o fecho prematuro dos estomas, o que afeta a fotossíntese; além das várias reações bioquímicas que são alteradas, e que influenciam o teor em diversos nutrientes, como o azoto, e metabolitos (Kramer, 1963). Jaleel *et al.* (2009) citaram algumas conclusões semelhantes, em diversas espécies: todo o alongamento e expansão celular são afetados, começando pela parte inicial do estabelecimento da planta, devendo-se sobretudo à baixa pressão de turgescência; a área foliar reduz consideravelmente, bem como a produção de matéria seca e número de folhas; o caule, em plantas como a soja, batata, salsa e feijão tem comprimentos inferiores, e pesos inferiores no caso da beterraba; em relação raiz apesar de em espécies como o girassol aumentar o comprimento, melhorando a sua capacidade de absorção e mantendo a pressão osmótica, diminui o peso seco em exemplo no choupo e reduz ligeira mas não significativamente o crescimento em espécies como o milho e o trigo; ocorre também um aumento do rácio entre raiz e parte aérea, em espécies como a beterraba o peso seco da parte aérea sofre maiores perdas do que a raiz, toda a produção de biomassa fresca e seca é afetada; por fim já para aspectos fisiológicos nomeadamente o teor de clorofila há uma redução com o agravar do stress.

Sinclair e Ludlow (1986) e Pimentel (2004) organizam a resposta da planta em quatro fases (Fig. 1): ligeiro défice hídrico; défice hídrico moderado; défice hídrico severo; défice hídrico letal.



Figura 1. Resposta das plantas ao stress hídrico de acordo com severidade do stress. Adaptado de Pimentel (2004).

Quanto à resistência ao stress hídrico pelas plantas Morando *et al.* (2014) propuseram que este fator esteja ligado com o tipo de planta, com as plantas C4 e CAM a serem mais eficazes na fotossíntese e no aproveitamento da água sob stress hídrico.

2.3. Azoto na planta

O azoto (N) é um dos macronutrientes essenciais, sendo o principal elemento limitante das produções vegetais (Santos, 1996). Esta limitação deve-se ao facto das plantas precisarem de azoto em grandes quantidades e de este ser um nutriente muito móvel, portanto bastante sujeito a lixiviação (Ellis & Foth, 1996). É absorvido sobretudo pelas raízes geralmente em formas minerais, que representam 2-5% do N total do solo, tanto na forma nítrica (NO_3^-) como na amoniacal (NH_4^+) (Santos, 1996). A forma mais rápida e fácil de absorver é a nítrica, pois é mais móvel (maior risco de lixiviação), mais solúvel em água, não estando tão suscetível a ser retida pelo complexo de absorção do solo (argila e húmus, sobretudo) e não reagindo com outros constituintes que possam reduzir a sua solubilidade (Dias, 1997); Singh e Schulze (2015). A dinâmica do macronutriente, também descrita no ciclo do azoto, é-nos apresentada na forma de balanços entre os ganhos e perdas pelo sistema solo/planta. No solo, a transformação entre as formas orgânicas e minerais é concebida por processos de mineralização/imobilização, contudo no sistema também estão incluídos processos de fixação biológica de azoto elementar (N_2) pela folha, deposições atmosféricas, lixiviação, volatilização e erosão (Rodrigues, 2000). É importante realçar que o conteúdo de azoto não aumenta infinitamente, tendendo para um equilíbrio entre adição e perdas. Essas perdas no sistema são resultantes da volatilização, da lixiviação e da desnitrificação (Ellis & Foth, 1996).

O azoto corresponde entre 1 a 5% de toda a matéria seca da planta e 40 a 50% do protoplasma das células, sendo um constituinte de compostos e complexos minerais orgânicos vitais para a planta (Santos, 1996). Este nutriente é necessário para a síntese de aminoácidos, proteínas, clorofila, ácidos nucleicos, lipídios e uma variedade de outros metabolitos que o contêm na sua estrutura Kusano *et al.* (2011). O mesmo autor reforça que este é o elemento mais crucial para o crescimento e metabolismo da planta, e que com recurso à metabolómica¹ é possível retirar informação básica sobre a sua influência na planta face a mudanças fisiológicas ou ambientais.

Como referido anteriormente, o azoto é geralmente absorvido, pelas raízes, na forma de NH_4^+ e NO_3^- , por fluxo de massa, interceção radicular e difusão. Com a rápida nitrificação em solos arejados e com pH entre 6 e 8, a forma predominantemente absorvida é o NO_3^- , sendo que esta forma solúvel é rapidamente absorvida pela raiz por fluxo de massa. Já em solos em que existe elevada acidez,

¹ A metabolómica é usada para estudar o estado metabólico das células.

condições de fraco arejamento e pouca ou nenhuma nitrificação, a principal forma absorvida é o NH_4^+ . Além disso, plantas calcífugas naturalmente preferem essa forma (Ellis & Foth, 1996).

2.3.1. Stress de azoto na planta

A privação de nutrientes na planta pode ter graves impactos negativos no seu vigor que estão associados a problemas como uma reduzida capacidade competitiva do individuo, fecundidade reduzida, maior suscetibilidade a pragas e doenças, e menor rendimento (no caso de se tratar de uma cultura) (Wiedenhoeft, 2006). Foth (1978) mencionou que, nos tecidos a falta de um nutriente móvel, como o azoto, resulta na translocação do nutriente das folhas mais basais (velhas) para as mais novas. Desta maneira, os primeiros sintomas de carência dão-se nos tecidos mais antigos. Segundo Greenwood (1976), o stress de azoto pode ser definido como uma estimativa quantitativa da intensidade do défice do elemento numa planta/cultura. É uma percentagem, avaliada pela razão entre diferença da taxa de crescimento máximo (quando não existem limitações) e a taxa de crescimento com défice, pela taxa de crescimento máximo (equação 1).

Equação 1. Estimativa quantitativa percentual do stress de azoto na cultura (Greenwood, 1976).

$$\text{Stress de azoto (\%)} = 100 \times \frac{(\text{taxa de crescimento N máximo}) - (\text{taxa de crescimento com defice})}{\text{taxa de crescimento N máximo}}$$

O suplemento de azoto é fundamental para o desenvolvimento e crescimento das plantas, uma vez que é necessário para a síntese proteica, afetando direta ou indiretamente quase todos os processos da célula e, assim sendo, é responsável pela síntese de novas células e tecidos vegetativos, incluindo a produção de componentes de rendimento, que dão origem aos órgãos reprodutivos e sementes (Fernandes *et al.*, 2021). Sendo o azoto um constituinte da clorofila, o seu défice expressa-se como uma clorose das folhas, sendo que, em casos de carência extrema, as folhas ficam necróticas (Roy *et al.*, 2006). Ciompi *et al.* (1996) referiram que o défice em azoto provoca modificações em vários parâmetros morfológicos e fisiológicos da planta, como limitação na produção de biomassa, no número de folhas, na área foliar e na eficiência da fotossíntese. Esta ideia é também reforçada por McCauley *et al.* (2009) que explicam que quantidades insuficientes de azoto também irão afetar os grãos dos cereais (baixo teor proteico) e os caules ficarão delgados. Regato *et al.* (2004)

justificaram que o azoto é importante para o aumento da diferenciação floral, redução da queda dos frutos, aumento da relação polpa/caroço e o aumento da consistência da polpa, com a sua carência levando a um rápido envelhecimento do pomar e uma menor resistência ao frio, em culturas como o pessegueiro. Além disso, irá ocorrer uma limitação no crescimento, no número de folhas e na área foliar, assim como na assimilação de CO_2 , na condutância estomática e na eficiência da fotossíntese. Arora *et al.* (2001) também referiram que a fotossíntese é muito afetada pelo conteúdo em azoto nas folhas, e que esta relação pode variar bastante entre espécies. Estas relações negativas entre a falta de azoto e baixas taxas fotossintéticas devem-se em grande parte ao elevado teor de azoto da maquinaria fotossintética como os pigmentos e a RuBisCO, esta última sendo uma enzima que desempenha um papel fundamental na assimilação de carbono (Machado *et al.*, 2021). Folhas com elevado conteúdo em azoto conseguem taxas fotossintéticas superiores e têm uma maior eficiência na carboxilação, contudo a taxa de assimilação do CO_2 por unidade de azoto é menor nesses casos (Arora *et al.*, 2001).

Geralmente a carência de azoto leva a um menor desenvolvimento radicular da planta (Kant *et al.*, 2011), contudo Liu *et al.* (2020) relataram que, na cultura do trigo o défice em azoto modificou a morfologia da raiz, melhorando a sua estrutura, o que por sua vez, aumentou a capacidade de absorção e a eficiência no uso do azoto, mas reduziu a fotossíntese e taxa metabólica. O mesmo autor referiu que a carência do elemento altera a expressão génica em outras plantas como a soja e a cevada, induzindo uma regulação positiva de genes na raiz, mas negativa na parte aérea. Já no caso do milho quase 2 milhares de genes expressaram-se diferentemente.

Por fim, alguns autores afirmam que o azoto é necessário em grandes quantidades em quase todas as fases de crescimento da planta, principalmente na fase vegetativa, durante o qual a sua disponibilidade afeta a produção da RuBisCO, e, portanto a fotossíntese (Amaral e Oliveira (2020). As plantas C4 realizam a fotossíntese de forma mais eficiente, com menos gastos energéticos, e são mais tolerantes a stresses ambientais, pois a “RuBisCO” atua apenas como carboxilase (responsável pela fixação de CO_2), e não é responsável pela respiração celular como ocorre nas C3 (Carvalho *et al.*, 2012).

2.4. Stress combinado

Apesar de existirem vários estudos sobre a resposta fisiológica das plantas ao stress individual de água ou de azoto, os efeitos das duas variáveis combinadas não têm a atenção devida (Arora *et al.*, 2001; Sousa, 2019).

Skinner e Comas (2010) avaliaram os stresses em separado, contudo, concluíram que têm efeitos semelhantes no aumento da quantidade de biomassa e da profundidade das raízes de 23 culturas forrageiras de clima temperado. Joel *et al.* (1997) investigaram o efeito combinado do stress hídrico e de azoto na cultura do girassol, afirmando que os dois fatores não se multiplicaram na produção de biomassa. Corti *et al.* (2017) examinaram a imagem hiperespectral do espinafre sob o stress combinado, de forma a poderem estimar a sua biomassa, e o estado hídrico e de azoto da cultura, demonstrando que o conteúdo de água nos tecidos não sofreu alterações significativas com os diferentes tratamentos de azoto mas que o peso seco e o conteúdo de azoto sofrem bastante com o stress hídrico. Guilpart *et al.* (2014) averiguaram o stress combinado na vinha, sumariando que as inflorescências são gravemente afetadas, resultando em perdas de produção na ordem dos 65-70%, no ano que se seguia. Humbert *et al.* (2013) sugeriram também que o stress combinado afeta de forma multiplicativa a quantidade de grãos e a eficiência no uso de água na cultura do milho, contudo, avaliando a resposta da planta a nível molecular torna-se bastante mais exigente e complexo. Eghball e Maranville (1993) avaliaram o stress combinado em quatro cultivares de milho tanto em estufa como no campo. Na estufa algumas plantas sofriam um stress provocado por ausência de rega durante 8 dias e o resto era regado diariamente, enquanto que no campo era praticado um regime de sequeiro e um de regadio, todas as plantas estavam divididas equitativamente sobre diferentes dosagens de azoto. Os autores sugeriram que a elevada disponibilidade de azoto afeta a capacidade de lidar com o stress hídrico. Isto é, se houver limitada quantidade de azoto disponível no solo a planta aloca mais recursos na raiz, melhorando a sua estrutura e comprimento, caso a raiz seja mais comprida há maior capacidade de absorção de água e consequentemente mais tolerância à baixa disponibilidade de água. Contudo, é preciso ter em atenção que esta adaptação ocorre com stresses moderados, aquando de stresses elevados de água o sistema radicular da planta regista valores inferiores de peso seco e comprimento, limitando também a absorção de azoto. O oposto também ocorre, stresses elevados de azoto danificam a raiz e limitam a sua performance. Basal e Szabó (2020) estudaram também os stresses hídrico e de azoto de maneira combinada na soja numa experiência levada a cabo entre abril e setembro em 3 épocas consecutivas (2017, 2018 e 2019), sob 3 regimes hídricos (não regado, regado pela metade e totalmente regado) e 3 regimes de aplicação de azoto (0, 35 e 105 kg ha⁻¹). Estes autores referiram que elevada disponibilidade de azoto não é recomendada com a ausência de seca pois diminui o número de flores, altura da planta e rendimento da semente. Contudo, uma adubação

azotada adequada proporcionou valores superiores de SPAD (teor de clorofila) nos estados vegetativos e nos primeiros estados reprodutivos, aquando do stress hídrico. Este aumento foi justificado com a diminuição de biomassa, que proporcionou um teor de azoto disponível superior nas folhas. Além disso, graças a essa adubação o peso fresco da planta reduziu muito levemente no regime de sequeiro, comparado com os regimes regado pela metade e totalmente regado (4 e 5,3%, respetivamente). Já Song *et al.* (2019) investigaram cuidadosamente a resposta de uma cultivar de choupou em carência hídrica sob um nível adequado e baixo de azoto. Daí concluíram que o desenvolvimento radicular aumentou com um fornecimento adequado de azoto em condições de seca, aumentando a disponibilidade de ácido indolacético que contribuiu para adaptações no xilema, disponibilizando também em maior quantidade o ácido abscísico na folha, responsável pelo melhor regulamento dos estomas e maior eficiência no uso de água, promovendo também uma defesa antioxidante nas folhas. Além disso, Gholinezhad *et al.* (2009) analisaram o efeito do stress hídrico (3 regimes hídricos: stress severo (50% capacidade de campo), moderado (70% capacidade de campo) e irrigação ótima (90% de capacidade de campo) no girassol, sob a influência de diferentes dosagens de azoto (100, 160 e 220 Kg ha⁻¹), verificando uma tendência, não significativa, para um menor índice de área foliar à medida que o stress hídrico aumentava, que limitou a capacidade de absorção de NO₃⁻ do solo, e uma tendência, significativa, para um maior índice à medida que se aumentava a dosagem de azoto fornecido.

2.5. Tomate

O tomate é uma das hortícolas mais importantes em todo o mundo. O seu consumo contribui para uma dieta saudável e equilibrada, devido ao seu conteúdo em minerais, vitaminas, nomeadamente a B e C, aminoácidos, açúcares, fibras, ferro e fósforo. Sendo consumido tanto em fresco como processado tendo com grande importância económica (Naika *et al.*, 2006), a nível mundial e em Portugal (FAOSTAT, 2021).

O tomate é uma planta herbácea perene mas é geralmente cultivada anualmente em regiões temperadas, pois é sensível à geada. Atualmente é cultivada de forma semelhante a um arbusto, com menos de três nós entre inflorescências e uma produção de fruto que facilita a colheita mecanizada. Pensa-se que cerca de 20 genes foram alterados para aumentar o seu tamanho para o dos dias de hoje. Nos

últimos 50 anos, a reprodução do fruto mudou muito as suas características, tornando-o resistente a várias doenças e adaptado a várias regiões (Jones, 2007).

2.5.1. “*Solanum lycopersicum*”

O tomate é originário da América do Sul, mais particularmente, Peru e ilhas Galápagos, tendo sido domesticado pela primeira vez no México. Em meados do século XVI foi introduzido na Europa pelos exploradores Portugueses e Espanhóis, mas de início apenas era consumido pelos Italianos e Espanhóis, pois na altura pensavam que a fruta era venenosa, como o seu parente beladona. No século XVIII o tomate começou a ser comido com frequência, apesar de ainda estar listado como planta venenosa (Jones, 2007).

Em 1753, Linnaeus classificou o tomate cultivado no género “*Solanum*”, e com o nome de “*Solanum lycopersicum*” agrupou todas as espécies multiloculares descritas por Tournfort. Atualmente o tomate é amplamente aceite com a classificação de Linnaeus, devido a resultados de análises morfológicas e moleculares que revelaram semelhanças com a batata (Razdan, 2006).

O facto de o tomate pertencer à ampla família “Solanaceae”, faz com que esteja intimamente relacionado com muitas outras culturas comercialmente importantes como batata, beringela, pimentão, tabaco e petúnias. Desta forma, o conhecimento obtido em estudos com tomate pode ser facilmente aplicados a essas espécies, tornando-o num importante material de pesquisa (Kimura & Sinha, 2008). Estas espécies são uma pequena fração das 1700 (Weese & Bohs, 2007) ou 2000 (Kaunda & Zhang, 2019) existentes do género *Solanum*, um dos maiores e mais complexos géneros angiospérmicos. De onde se encontram plantas com aplicações alimentares (tanto silvestres como cultivados), ornamentais e medicinais, de onde são encontrados cerca de 670 compostos de interesse, 17 deles amplamente estudados por propriedades anticancerígenas e antioxidantes. Segundo Gerszberg *et al.* (2015) o interesse no estudo do tomate deve-se ao facto de: “este crescer em diferentes condições de cultivo; ter um ciclo de vida relativamente curto; da boa capacidade de produção de sementes; de ter um genoma relativamente pequeno (950 Mb); da alta autofertilidade e homozigose; da forma fácil de controlar a polinização e hibridização; da capacidade de propagação assexuada por enxerto; e possibilidade de regenerar plantas inteiras de diferentes explantes”. O autor refere a cultivar modelo com todas as características acima retratadas é a “Micro Tom”. O tomate é uma espécie diploide com $2n=2x=24$ cromossomas (Díez & Nuez, 2008).

2.5.2. Cultura do tomate em Portugal e no mundo

O tomate para consumo em fresco foi a cultura hortícola com maior produção, no nosso país, no ano de 2017, ultrapassando as 97 mil toneladas e ocupando mais de 1400 ha (Fig. 2). Contudo, grande parte do tomate produzido em Portugal é para indústria, chegando, no mesmo período, às 1,8 milhões de toneladas e 19,5 mil ha / ano. A maior parte do produto produzido para indústria é do Alentejo, 1,2 milhões de toneladas (66,7%), e área metropolitana de Lisboa, 300 mil toneladas (16,7%) (INE, 2018).

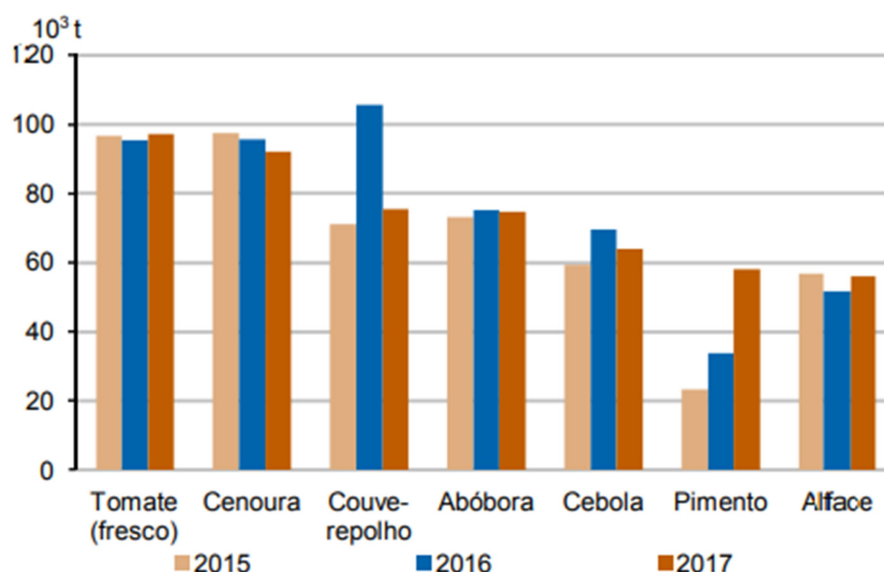


Figura 2. Produção das principais culturas hortícolas em Portugal, entre 2015 e 2017. Retirado de INE (2018).

A China é o principal país produtor de tomate, seguida pelos EUA, Turquia, Índia e Itália. Ásia é o continente com maior produção de tomate, produzindo 50% do total mundial (Díez & Nuez, 2008). Já na União Europeia cultiva-se, anualmente, cerca de 275 mil ha e 18 milhões de toneladas. E mundialmente 4,8 milhões de ha e 176 milhões de toneladas (FAO, 2019).

2.5.4. Efeitos Morfo-fisiológicos do Stress Hídrico e de Azoto no Tomate

A germinação do tomate necessita da absorção de água (hidratação), sendo que a expansão celular resulta da importação da água (através das aquaporinas) e dos açúcares transportados, ficando mais limitada aquando do stress hídrico (Atherton & Rudich, 2012). Na verdade, um dos efeitos iniciais do stress hídrico é uma germinação ineficiente e/ou lenta e a redução do vigor e estabelecimento das plântulas

(Machado *et al.*, 2021). O stress hídrico pode ter grandes impactos no crescimento e desenvolvimento da planta devido especificamente à redução do potencial hídrico, conteúdo relativo de água e turgor, que consequentemente aumenta a concentração de solutos no citosol. Essas mudanças prejudicam o alongamento e a expansão celular, levando à inibição do crescimento (Machado *et al.*, 2021; Nonami, 1998; Selim & El-Nady, 2011). Pervez *et al.* (2009) avaliaram a cultivar “MoneyMaker” onde demonstraram um decréscimo significativo na altura da planta, número de folhas, frutos e peso dos frutos especialmente em plantas que sofriam com stress hídrico desde fases mais precoces, e um decréscimo não significativo na percentagem de germinação de sementes e de frutos de plantas que sofriam um stress mais tardio. O stress devido à escassez de humidade e a exposição a períodos secos prolongados provoca a queda de botões e flores e o rachar dos frutos (Naika *et al.*, 2006). O desenvolvimento de uma área foliar ideal é de extrema importância para a fotossíntese e, consequentemente, para o crescimento das plantas, sendo das principais características afetadas pelo stress hídrico que limita a produtividade da cultura (Machado *et al.*, 2021). O stress hídrico limita a expansão foliar interrompendo o fluxo de água do xilema para as células em alongamento, reduzindo a turgescência e prejudicando a fotossíntese (Hsiao & Xu, 2000). Além disso, estudos sugerem que a redução da área foliar específica é provavelmente uma estratégia para lidar com o stress hídrico, pois folhas mais grossas geralmente têm um maior teor de clorofila e proteína, apresentando assim uma maior capacidade fotossintética e, portanto, uma maior produção de biomassa (Machado *et al.*, 2021). Pokluda *et al.* (2010) teve uma conclusão semelhante na área específica, demonstrando valores na cultivar “Proton” de $163 \text{ cm}^2\text{g}^{-1}$ e $184 \text{ cm}^2\text{g}^{-1}$ com stress hídrico e controlo, respetivamente. Khan *et al.* (2015) avaliaram a cultivar “Bombino” e sugerem que no tomate a fotossíntese é gravemente afetada, visto que a água é um dos seus componentes essenciais, há fecho dos estomas para evitar perdas, um crescimento foliar com perdas superiores às do crescimento radicular. Da mesma forma todo o peso e altura da planta são afetados. Já Selim e El-Nady (2011) demonstraram as repostas da planta sobre diferentes regimes de stress hídrico, 100% (controlo), 80%, 60% e 40% de capacidade de campo, durante duas temporadas de cultivo para a cultivar “Strain B”. Com 80% a planta obtinha melhores resultados do que o tratamento controlo para o peso seco de raiz, caule, folhas e total da planta, para área foliar total, área foliar específica, rácio de área foliar e peso da folha na planta e índice de área foliar. Contudo, nos stresses de 60% e 40% os resultados eram totalmente opostos, apesar de um uso de água mais eficiente. O autor justifica o sucedido pela fotoinibição, em que ocorre o fecho dos

estomas diminuindo a saída de água por transpiração, mas também não existem trocas gasosas, há menos CO₂ disponível para os cloroplastos realizarem a fotossíntese. Nahar e Gretzmacher (2011) avaliaram a resposta da raiz e parte aérea de 7 cultivares de tomate, em hidroponia, com stresses provocados pela interrupção do fornecimento de água durante períodos de 20, 25 e 30 minutos diários, stress leve, médio e elevado, respetivamente. As plantas menos tolerantes ao stress tiveram perdas graduais de peso seco um pouco por toda a planta. Por fim, apesar de não se encontrar informação específica para o tomate, a partir destas observações é espectável que, à semelhança de outras plantas, como descrito anteriormente de Kramer (1963), a proporção raiz/parte aérea seja aumentada.

Quanto ao azoto, trata-se de um componente de várias enzimas estando envolvido no metabolismo de toda a planta (Atherton e Rudich (2012)). No tomate, existem vários mecanismos associados ao menor desenvolvimento das plantas devido à falta de azoto: excesso de depósitos de hidratos de carbono nas células vegetativas, o que afeta o crescimento apical; realocação de auxina da parte aérea para as raízes para o crescimento lateral da raiz, diminuindo a quantidade de auxina encontrado no meristema apical, e consequentemente afetando o desenvolvimento do caule; indução da síntese de ácido abscísico nas folhas, levando a uma redução da extensibilidade da parede celular; diminuição da atividade fotossintética consequente do elevado número de substâncias dependentes deste elemento usadas durante este processo (Machado *et al.*, 2021). Sendo assim, o défice de azoto resulta num crescimento delgado e atrofiado, as folhas tornam-se pequenas e de cor amarela, sendo que as mais velhas morrem prematuramente, e há pouca formação de frutos (Atherton & Rudich, 2012). Okunlola *et al.* (2015) avaliaram uma cultivar de tomate sob diferentes regimes de fornecimento de azoto, onde foi possível observar um aumento linear e significativo da altura da planta, número de folhas, área foliar, peso fresco da planta e número de flores e frutos com o aumento da disponibilidade de azoto.

É importante referir que Sousa (2019) fez um ensaio na cultivar “Micro-Tom” com regimes de stress hídrico, de azoto e o stress combinado dos dois, em estados precoces de desenvolvimento (dia 10 e dia 16). Comparando o stress hídrico com o tratamento controlo não foi possível demonstrar efeitos negativos significativos para nenhum dos parâmetros avaliados (como por exemplo no peso seco de raízes, caules e folhas, comprimento da raiz, altura da planta, número de folhas e área foliar). Contudo foi possível observar um aumento no comprimento das raízes bem como na eficiência no uso de água das plantas submetidas ao stress hídrico comparativamente aos controlos. Já o tratamento de stress de azoto teve efeitos negativos bastante mais

acentuados (exemplo disto é o teor de clorofila e a área foliar ao dia 16) sugerindo que, para os métodos experimentais utilizados, este teve um maior impacto no stress combinado do que o stress hídrico. Nestes dois stresses (azoto e combinado) são de notar as tendências para médias inferiores ao dia 16 no peso fresco da raiz, parte aérea e total, área foliar e teor de clorofila, e superiores nos consumos de água por área foliar, apesar de um desenvolvimento inicial superior nos primeiros 10 dias no comprimento da raiz e seu peso seco. Apesar de não se saber o comportamento da planta a médio/longo prazo sob o stress combinado é possível observar um comportamento semelhante com o de stress de azoto, já no caso do stress hídrico as diferenças observadas foram ténues, sendo que o efeito negativo não parece ter sido multiplicativo dos dois stresses em combinado, contrariando o que havia sido sugerido por Joel *et al.* (1997) para a cultura do girassol.

Por fim, o N influencia bastante a qualidade da produção de tomate, sendo necessário para a formação adequada de folhas, que também irão proteger o fruto do sol. Além do mais, tem um papel fundamental na maturação do fruto, isto é, nas primeiras fases do ciclo, demasiado azoto irá contribuir para o crescimento vegetativo em detrimento do crescimento e maturação do fruto, e se houver deficits do nutriente (no caso de ser lixiviado) a fotossíntese, a produção de fotoassimilados e a qualidade do fruto irão ser comprometidas (Gould, 2013).

Os efeitos morfo-fisiológicos associados ao stress hídrico, azoto e o combinado de ambos, no tomate, estão sumarizados na figura 3.

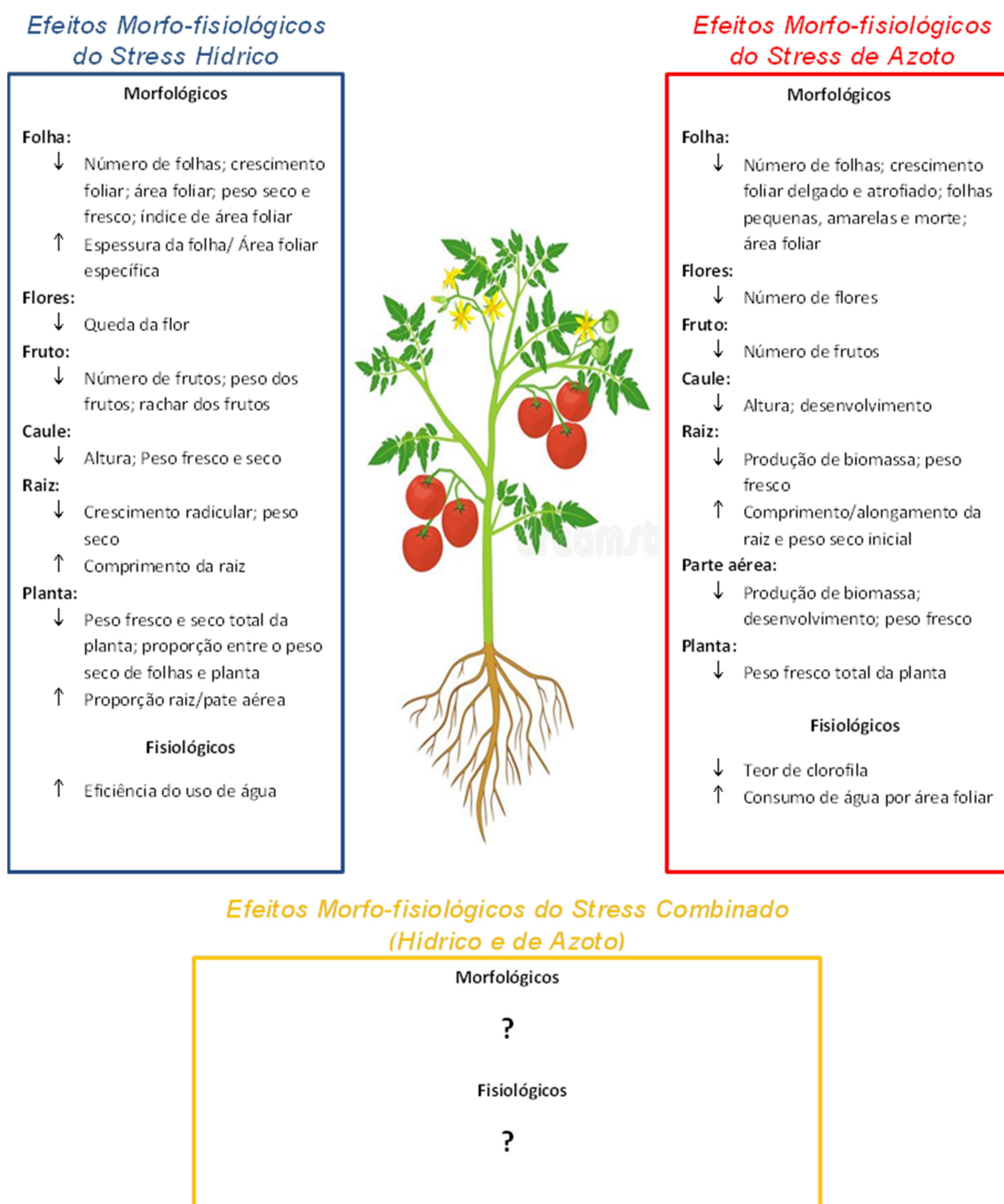


Figura 3. Respostas morfo-fisiológicas nos diferentes órgãos do tomateiro face ao stress hídrico, de azoto e do combinado de ambos.

2.6. Estratégias sustentáveis para o aumento da eficiência do uso de água e azoto

A competição por recursos hídricos e terra arável, para uso doméstico e industrial é imensa. Desta forma, a eficiência do uso de água e o aumento da produtividade das culturas agrícolas podem e devem ser melhorados (Du *et al.*, 2015). À semelhança do que foi dito essa crescente necessidade de produzir mais e atingir

rendimentos máximos leva também a um aumento do uso de fertilizantes azotados (Fernandes *et al.*, 2021; Liang *et al.*, 2019). Este uso exacerbado de recursos representa graves consequências para o ambiente (Figueira, 2007). Com esta corrente de pensamento é imperativo investigar estratégias sustentáveis capazes de aumentar a eficiência do uso água e de azoto em culturas economicamente importantes, como o tomate (Du *et al.*, 2018). Uma das eventuais estratégias consiste no uso de bioestimulantes, que são produtos ou substâncias que estimulam processos naturais das plantas, como a absorção de nutrientes e a tolerância a stresses bióticos e abióticos (Zandonadi, 2018) e a outra na identificação de genótipos mais adaptados a níveis inferiores de água e azoto, bem como os mecanismos que conferem essa tolerância (Bharadwaj, 2016).

2.6.1. Bioestimulantes

O uso de alternativas aos tradicionais nutrientes minerais, como os bioestimulantes, têm vindo a ganhar relevo como formas sustentáveis de nutrição das plantas. Estas são alternativas orgânicas, teoricamente mais baratas e de menor impacto ambiental, que se podem aliar ao crescimento e nutrição das culturas. São “produtos ou substâncias que estimulam processos naturais da planta como absorção de nutrientes e a tolerância a stresses abióticos”. Estes podem-se dividir em quatro grupos principais: os aminoácidos e hidrolisados de proteínas, as substâncias húmicas, os microrganismos e inóculos, e os extratos de algas (Zandonadi, 2018). Outra definição semelhante adotada pelo Conselho Europeu da Indústria de Bioestimulantes (EBIC) é a de que são produtos “que contêm substâncias e/ou microrganismos cuja função, quando aplicada a plantas ou rizosfera, é a de estimular processos naturais para aumentar/beneficiar a absorção de nutrientes, eficiência de nutrientes, tolerância ao stress abiótico e qualidade da cultura ” (Brown & Saa, 2015).

2.6.1.1. Inoculantes microbianos

Inoculantes são produtos que possuem na sua composição microrganismos vivos capazes de beneficiar o desenvolvimento de diferentes culturas (Santos *et al.*, 2019). De acordo com Gomes (2019), alguns dos inoculantes microbianos foram reconhecidos por terem um efeito positivo no desenvolvimento da planta, em relação à tolerância ao stress hídrico. Já existem inoculantes responsáveis pela solubilização do fósforo, que aumentam a absorção do elemento e o rendimento das culturas (Igual *et al.*, 2001). Bashan *et al.* (1996) partilham um estudo referente a estes bioestimulantes, protegidos por um polímero sintético, de maneira a prolongar o tempo de vida útil do

produto. A juntar aos exemplos descritos, existe ainda um grupo muito importante de microrganismos responsáveis pela fixação de azoto no solo, ajudando também na solubilização e absorção de fosfato, os *Rhizobium*. Estas bactérias, em grande parte simbióticas, têm sido usadas há largas décadas na agricultura, permitindo uma redução na dependência de fertilizantes químicos azotados além de aumentarem a produtividade das leguminosas (Kuykendall *et al.*, 2015). No entanto, Baez *et al.* (2017) enfatizam que a capacidade destes microrganismos potencializarem o crescimento das culturas está bastante limitada por fatores como o tipo de solo, condições climáticas, variedade da cultura, genótipo bacteriano, a tecnologia de inoculação adequada, entre outras. Esta ideia foi reforçada por Almeida e Soratto (2014), que explicaram que os efeitos dos bioestimulantes na nutrição de culturas “são escassos e contraditórios, com grande variabilidade dos resultados em função da dose, da forma de aplicação, da cultura, do ambiente e das práticas agrícolas utilizadas”.

2.6.1.2. *BlueN*®

Existem vários inóculantes no mercado, como por exemplo: Sil-All®, Silobac® e Pioneer 1174® usados em milho na silagem (Rodrigues *et al.*, 2004); Simbiose Nod®, Simbiose Maíz®, StimuControl® e NemaControl® usados na semente da Soja como proteção contra pragas (Pasini *et al.*, 2020); ou o Stimulate® e Radifarm® usados em hortícolas como o pimento e pepino para uma melhor germinação, vigor da semente e o desenvolvimento das plântulas (Fagioli *et al.*, 2012).

A *Symborg* desenvolveu o *BlueN*®, um produto com o objetivo de reduzir as aplicações de azoto e de fornecer uma ferramenta útil para a agricultura que permita uma maior poupança económica e preservação do meio ambiente. Trata-se de um bioestimulante composto por uma bactéria endófito “*Methylobacterium symbioticum*”. A bactéria fixa o azoto atmosférico (N_2), sendo aplicada por aspersão na folha, nos primeiros estados de desenvolvimento da planta (Fig. 4) (Symborg, 2020).

Já foram conduzidos ensaios que comprovam a eficácia do produto em relação ao índice SPAD, percentagem de de azoto na folha e produtividade, em comparação a plantas que dependiam apenas da fertilização azotada convencional de cobertura. Essas culturas foram o trigo, milho, arroz, os citrinos, a vinha, a framboesa, o pimento e a chicória (Symborg, 2020). Contudo ainda não há estudos, que demonstrem as sua eficácia em tomate.

BlueN garante o fornecimento eficaz e controlado de azoto à planta, durante todo o seu ciclo.



Figura 4. Esquema exemplificativo da forma de atuação do bioestimulante BlueN® na planta. Retirado de Symborg (2020).

2.6.2. Seleção de Genótipos Tolerantes

À semelhança do que foi descrito por Morando *et al.* (2014) e Razdan (2006), as plantas que crescem em regiões com falta de água podem optar por três mecanismos de sobrevivência: completar o ciclo fisiológico na altura de chuvas (evitando a seca); desenvolver características particulares, isto é, raízes profundas, reduzida área de transpiração ou aumentar a camada de cutina; e plantas que crescem com um teor Por exemplo, Nahar e Gretzmacher (2011), observaram que as duas variedades de tomate mais tolerantes ao stress hídrico obtinham valores superiores de razão raiz/parte aérea, peso seco e comprimento da raiz, havendo uma maior mobilização de biomassa na raiz, o que constituía uma vantagem adaptativa. Moles *et al.* (2018) estudaram dois genótipos de tomate (de uma cultivar autóctone do sul da Itália chamada *Ciettaicale* e a conhecida cultivar comercial *MoneyMaker*) para avaliar a resposta de folhas e raízes a 20 dias de deficit hídrico e sugeriram que um melhor alongamento radicular e capacidade de absorção constituem uma vantagem na tolerância ao stress hídrico. Esta adaptação permitiu à variedade *Ciettaicale* (cultivar mais tolerante ao stress) ter mais plasticidade e manter as relações source-sink, obtendo menos perdas no peso seco (40%) do que a *MoneyMaker* (68,6%) em relação a um tratamento controlo, um aumento do rácio entre raiz e parte aérea e um maior teor de água na raiz. Quanto ao terceiro mecanismo, é preciso um ajuste osmótico, ou

seja, identificar genes que conferem aos fenótipos tolerantes uma resistência ao stress hídrico (Razdan, 2006). Este ponto confere uma grande vantagem, sendo mesmo o mecanismo fisiológico mais importante numa planta adaptada. (Atherton & Rudich, 2012). Diversos ensaios foram conduzidos na identificação de genótipos promissores há tolerância do stress hídrico. Um exemplo é o estudo de Rigano *et al.* (2016) que conduziram uma experiência com o genótipo “IL 9-2-5”, uma cultivar comercial tolerante com informação genética da silvestre *Solanum pennellii*, que exibe maior eficiência em relação ao stress hídrico pois tem um melhor sistema antioxidante que se traduz numa melhor morfologia e fisiologia da folha. Atherton e Rudich (2012) sugerem também que o híbrido com esta última cultivar tem melhor uso de água e menos desperdícios, apesar de uma área foliar superior. Nahar e Gretzmacher (2011) encontraram 2 variedades (BR-4 e BR-5), de entre 7 estudadas, com elevada eficiência contra o stress hídrico. Essas variedades obtiveram valores mais elevados de peso seco e comprimento da raiz e rácio raiz/parte aérea do que as restantes. Além disso, os autores sugerem que plantas tolerantes a stress hídrico possuem características morfológicas e metabólicas que lhes permitem manter um elevado grau de água nos tecidos, mesmo com escassez de água. Morales *et al.* (2015) chegaram mesmo a concluir que de entre os vários parâmetros morfológicos os melhores para uma seleção indireta de genótipos de tomateiro resistentes ao stress hídrico seriam a altura da planta e número de folhas. Demonstrando que essas plantas mais adaptadas têm poucas alterações na altura e número de folhas, pois têm um hábito de crescimento determinado², tendo mecanismos que naturalmente aumentam a eficiência do uso de água ou a resistência ao stress hídrico, como por exemplo mantendo a temperatura da folha o mais baixa possível. A planta tem a capacidade de continuar a transpirar, deixando a folha mais fresca, e realizar a fotossíntese sem diminuir o potencial hídrico da folha devido a uma maior entrada de água por um sistema radicular mais profundo e denso. Pokluda *et al.* (2010) e Kamanga (2020) justificaram o porquê da eficiência da folha, sugerindo que a planta sintetiza e acumula açúcares osmoprotetores, prolina e outras substâncias em pontos fulcrais dos tecidos, regulando o potencial osmótico, promovendo um melhor uso da água e CO₂, e uma

² “Tipo determinado: a planta não emite novos nós no caule após a floração. Pode aumentar a altura devido ao alongamento dos espaços entre os nós. As primeiras flores surgem no terço médio superior e as últimas no terço inferior do caule. Apresenta frutos axilares e no nó terminal. Normalmente, as folhas do ápice são semelhantes em tamanho às demais. Tipo indeterminado: a planta continua a emitir novos nós no caule após a floração. Apresenta frutos axilares e ausência ou poucos frutos no nó terminal. A floração inicia-se no terço inferior do caule. As folhas do ápice do caule apresentam tamanho menor do que as do terço médio e inferior” (Thomas, 2018).

fotossíntese mais eficiente, sem evitar a transpiração. O último autor estudou 12 cultivares de tomate, de entre elas uma muito tolerante ao stress hídrico, a “Star 9003”, e uma bastante sensível, a “Rodede”, demonstrando que apesar da cultivar tolerante ter menos CO₂ intercelular, tem melhores parâmetros fotossintéticos e mais eficiência na assimilação do gás, sugerindo ainda que na variedade sensível há um maior dano nos tecidos (maquinaria fotossintética e membranas celulares) provocado pelo stress oxidativo, resultante da fotoinibição pelo fecho dos estomas. É preciso salientar que se os processos de formação/limpeza das espécies reativas de oxigénio (provocadas pela fotoinibição) atingirem um equilíbrio este pode constituir uma resposta adaptativa da planta ao stress provocado (Moles *et al.*, 2018). Por fim, a “Star 9003” tem ainda uma folha bastante mais fina, e uma cutícula e parede celular mais densa, constituindo outro ponto a favor contra a perda de água. Ao contrário de variedades sensíveis que reduzem entre 50 a 60% do peso seco da parte aérea, área foliar e comprimento da parte aérea, nos tratamentos de stress em comparação com o controlo, a “Star 9003” manteve 60% do peso seco. Por fim, o autor sugeriu que o aumento da massa foliar por unidade de área, que é uma medida representativa da espessura da folha, e o ajuste osmótico da cultivar tolerante, por meio de acumulação de açúcares solúveis, mantêm a turgescência, atenuam a perda de água e aumentam o crescimento da planta, permitindo manter as atividades metabólicas mesmo em stress.

Em relação à fertilização, o desenvolvimento de genótipos eficientes é uma solução para o uso excessivo de suplementação mineral no cultivo (que representam um custo elevado na produção e resulta em graves problemas ambientais). Na maioria dos casos, uma melhor eficiência do uso de azoto nas plantas pode ser dividida em duas etapas: a eficiência com que as plantas absorvem o azoto do solo (eficiência de absorção) e como as plantas podem usar o azoto de forma mais eficiente (eficiência de utilização) (Garnett *et al.*, 2009).

A arquitetura da raiz foi apontada como uma característica crucial para melhorar a eficiência de absorção do azoto e reduzir as perdas de fertilizantes (Garnett *et al.*, 2009). Geralmente, a baixa disponibilidade de azoto diminui o crescimento da raiz do tomateiro, mas algumas cultivares tolerantes apresentam raízes mais vigorosas do que os sensíveis, o que implica uma associação entre o desenvolvimento da raiz e a eficiência o uso de azoto (Machado *et al.*, 2021). No tomate, duas cultivares contrastantes na eficiência do uso de azoto, “Regina Ostuni” (superior) e “UC82” (inferior), foram identificadas (Abenavoli *et al.*, 2016). O comprimento da raiz foi significativamente maior em 'RO' comparativamente a 'UC82', independentemente da

dose de fornecimento de NO_3^- , demonstrando assim o papel importante desta característica na eficiência do uso de azoto. Ruiz *et al.* (1998) estudaram 12 genótipos diferentes de tomate para produção, e também para a eficiência no uso do azoto. Os que se demonstraram mais eficientes na assimilação de azoto apresentaram maior concentração de NO_3^- foliar, maior atividade da nitrato redutase³, e maiores teores de proteína e azoto orgânico. Esta maior concentração de azoto foliar está relacionada a uma maior concentração de clorofilas e maiores taxas fotossintéticas culminando num melhor desenvolvimento da planta (Arora *et al.*, 2001; Roy *et al.*, 2006). Desta forma a capacidade de absorver e assimilar melhor o azoto, irá contrariar os efeitos da sua carência.

Os mecanismos morfo-fisiológicos de tolerância face ao stress hídrico e de azoto, descritos acima, no tomate, estão representados na tabela 1.

Tabela 1. Mecanismos morfo-fisiológicos de tolerância ao stress hídrico e de azoto.

Mecanismos de Tolerância ao Stress Hídrico			Mecanismos de Tolerância ao Stress de Azoto	
Completar o ciclo fisiológico na altura de chuvas	Desenvolver características adaptativas	Plantas que crescem com um teor reduzido de água nos tecidos	Melhor eficiência da absorção	Maior eficiência de assimilação
Como? Plantas com “ <i>timing</i> ” de reprodução ideais.	Como? Plantas com raízes mais desenvolvidas, reduzida área de transpiração ou maior espessura camada de cutina.	Como? Genótipos naturalmente mais eficientes com capacidade de ajuste osmótico. Podendo apresentar um hábito de crescimento determinado, com poucas alterações morfológicas ao stress.	Como? Genótipos com melhor estrutura, peso seco, comprimento e densidade da raiz.	Como? Plantas mais eficientes na assimilação de azoto. Apresentam em geral maior concentração de NO_3^- foliar e maiores teores de clorofila.

³ Enzima que catalisa a redução de nitrato em nitrito, sendo considerado um fator limitante no crescimento e desenvolvimento da planta.

3. Material e métodos

3.1. *Experiência 1: Efeito da aplicação do bioestimulante BlueN®*

A Hubel® Verde (do grupo Hubel®), estabelecida em 1995, é uma empresa dedicada à fertilização de culturas agrícolas no mercado português, sendo a representante nacional do bioestimulante BlueN® (Symborg S. L., Espanha). Esta empresa, expressou o interesse em testar o BlueN® em culturas em que a eficácia do produto não tinha sido ainda validada, nomeadamente em tomateiro. Neste sentido foi iniciado um ensaio numa câmara climática (*Climatic Chamber* FITOCLIMA 12.000 PLH, 2021) do *Campus* de Vairão (GreenUPorto/FCUP), Vila do Conde, em Outubro de 2020 para testar a sua eficácia em plantas de tomate (cv. Micro-Tom) submetidas a stress combinado de água e azoto.

3.1.1. *Desenho experimental e manutenção das plantas*

As sementes de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.), cv. “Micro-Tom”, foram germinadas em tabuleiros, num substrato comercial de germinação (Combo Sana®, Semilleros), na câmara climática com fotoperíodo de 16h com uma intensidade luminosa de $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura de 25 °C (período luminoso) / 23 °C (período noturno) e humidade relativa de 80%. Após um período de emergência de aproximadamente 10 dias, foram escolhidas plântulas homogéneas de forma a terem pelo menos 4cm de altura e 3 folhas, e as suas raízes foram lavadas para remoção do substrato de germinação.

De seguida, um total de 56 plântulas de tomateiro foram transferidas dos alvéolos de germinação para vasos individuais com vermiculite como substrato. Estes vasos foram regados até prefazer 100% da capacidade de campo, tendo sido aplicada para o efeito uma solução nutritiva completa ou uma solução com défice de N (dependendo do tratamento). Os vasos foram posteriormente cobertos com plásticos de polietileno (Fig. 5) de forma a não haver perdas de água por evaporação, pesados para manutenção do seu peso ao longo do período experimental e transferidos novamente para a câmara climática nas mesmas condições acima descritas excepto no que respeita a humidade relativa que foi reduzida para 70%.

As soluções nutritivas administradas inicialmente tinham a seguinte composição:

- Solução nutritiva completa (100% N): 10,5 de N; 10,0 de NO_3 ; 0,5 de NH_4 ; 1,9 de P; 1,9 de H_2PO_4 ; 6,1 de K; 3,6 de Ca; 1,6 de S; 1,6 de SO_4 ; 2,5 de

Mg; 2,6 de Cl; 0,5 de HCO_3 (mmol/L) e 35,0 de Fe; 10,0 de Mn; 20,1 de B; 0,9 de Cu; 5,0 de Zn; 0,5 de Mo ($\mu\text{mol/L}$) (pH=6 e CE= 2 dS/m)

- Solução nutritiva com carência de N (i.e. 50% da dose de N comparativamente à solução nutritiva completa): 5,3 de N; 5,0 de NO_3 ; 0,3 de NH_4 ; 1,9 de P; 1,9 de H_2PO_4 ; 6,1 de K; 3,6 de Ca; 4,8 de S; 4,8 de SO_4 ; 2,8 de Mg; 2,6 de Cl; 0,5 de HCO_3 (mmol/L) e 35,9 de Fe; 10,0 de Mn; 20,1 de B; 0,9 de Cu; 5,0 de Zn; 0,5 de Mo ($\mu\text{mol/L}$). (pH=6 e CE= 1,6 dS/m):

A experiência durou 21 dias após transplantação (i.e. até atingir 50% da capacidade de campo), com medições de peso diárias para manutenção da capacidade de campo do tratamento controlo, adicionando água destilada quando necessário, e monitorização da capacidade de campo do tratamento de stress combinado de água e azoto. Ao dia 3, foi aplicado o *BlueN*® por aspersão de 4,5 mL por planta (0,25 litros em solução aquosa de concentração 1g/L) com 14 réplicas biológicas por tratamento (Fig. 5).



Figura 5. Diferentes tratamentos utilizados: controlo com *BlueN*® (100% azoto e 100% de capacidade de campo, com *BlueN*®), controlo sem *BlueN*® (100% azoto e 100% de capacidade de campo, sem *BlueN*®), stress combinado com *BlueN*® (50% azoto e 50% de capacidade de campo, com *BlueN*®), e stress combinado sem *BlueN*® (50% azoto e 50% de capacidade de campo, sem *BlueN*®).

No dia 15 após plantação foram pesadas duas plantas por tratamento para determinar o seu peso fresco. Desta forma, foi possível subtrair ao peso completo do vaso (i.e. vaso com vermiculite, planta e água) o do peso da planta, para saber que fração desse peso corresponde a capacidade de campo (no caso do tratamento controlo).

O ensaio terminou quando os tratamentos de stress combinado com uma capacidade de campo inicial de 100% atingiram os 50% (por total ausência de irrigação), altura em que diversos parâmetros morfológicos e fisiológicos abaixo indicados foram avaliados.

3.1.2. Avaliação dos parâmetros morfológicos

No final da experiência foram pesados os vasos para determinação da quantidade de água consumida pelas plantas ao longo da experiência. As plantas foram recolhidas e a raiz das mesmas foi cuidadosamente lavada, e o comprimento raízes e altura das plantas foram determinados. Seguidamente, a parte aérea foi separada em caule e folhas, tendo sido contado o nº de folhas e determinada a sua área foliar (LI3100 (Licor, USA). O peso fresco das raízes, caule e folhas foi também registado, seguido do peso seco após secagem a 105 °C, durante 72 h numa estufa ventilada (Binder).

Para obtenção de outros indicadores morfológicos as seguintes equações foram aplicadas:

Equação 2. Proporção da parte aérea em relação à raiz.

$$\text{Proporção da parte aérea em relação à raiz} = \frac{\text{Peso seco da parte aérea}}{\text{peso seco da raiz}}$$

Equação 3. Área foliar específica.

$$\text{Área foliar específica} = \frac{\text{Área foliar}}{\text{Peso seco das folhas}}$$

Equação 4. Proporção do peso da folha em relação à planta.

$$\text{Proporção do peso da folha em relação à planta} = \frac{\text{Peso seco da folha}}{\text{Peso seco da planta}}$$

Equação 5. Proporção área foliar.

$$\text{Proporção área foliar} = \text{Área foliar específica} \times \text{Proporção peso folha em relação à planta}$$

3.1.3. Avaliação dos parâmetros fisiológicos

3.1.3.1. SPAD

No último dia do ensaio, foram recolhidos os teores relativos de clorofila/índices SPAD (SPAD 502 plus Konica Minolta, Japão) em leituras obtidas em triplicado na folha mais jovem totalmente desenvolvida de cada planta (n= 56).

3.1.3.2. *Eficiência do uso de água*

Tendo em consideração a biomassa produzida pela planta e a água consumida ao longo do ensaio as seguintes equações foram aplicadas para determinação da eficiência do uso de água pelas plantas e consumo de água em função da área foliar:

Equação 6. Eficiência do uso de água.

$$\text{Eficiência do uso de água} = \frac{\text{Peso seco total}}{\text{Consumo de água}}$$

Equação 7. Consumo de água por área foliar.

$$\text{Consumo de água por área foliar} = \frac{\text{Consumo de água}}{\text{Área foliar}}$$

3.1.4. *Análise estatística*

Na análise estatística usou-se o programa IBM SPSS Statistics 26. As médias foram comparadas individualmente, por tratamento com e sem BlueN®, recorrendo-se a um “T-Test”, as diferenças foram consideradas significativas para um $p \leq 0,05$.

3.2. *Experiência 2: Efeito do stress combinado em génotipos contrastantes*

O ensaio referente aos génotipos contrastantes foi realizado numa câmara climática do *Campus* de Vairão (GreenUPorto/FCUP), Vila do Conde. Foram avaliadas respostas morfológicas e fisiológicas de dois génotipos de tomate (um eficiente e outro não eficiente), com tamanhos semelhantes, após exposição a quatro tratamentos com dosagens de água e azoto distintas.

3.2.1. *Desenho experimental e manutenção das plantas*

As sementes de tomateiro foram germinadas num substrato comercial de germinação (Combo Sana®, Semilleros), numa câmara de climática com condições climáticas iguais às acima descritas para a germinação na Exp. 1. Após 15 dias, as plântulas com pelo menos 6 cm de altura e as mais homogêneas possível, foram selecionadas e lavadas as suas raízes para remoção de substrato de germinação. As plantas foram então transferidas para vasos individuais que se encontravam a 100% da capacidade de campo com uma solução nutritiva completa ou com defice em N, dependendo do grupo tratamento, contendo vermiculite como substrato. Os vasos foram posteriormente cobertos com plásticos de polietileno de forma a não haver perdas de água por evaporação, pesados para manutenção do seu peso ao longo do

período experimental e transferidos novamente para a câmara climática (fotoperíodo: 16h, intensidade luminosa: $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura: 25 °C (período luminoso) / 23 °C (período noturno), humidade relativa: 70%). Todos os vasos dos tratamentos controlo e stress de azoto foram mantidos à capacidade de campo de 100%, da mesma forma da exp. 1. Os vasos de stress hídrico e de stress combinado não levaram mais água até ser atingida a capacidade de campo de 50%, altura em que a mesma foi mantida a esse nível, através de adição de água desionizada, até ao ensaio terminar. O ensaio deu-se por terminado quando os sinais de carência de azoto se tornaram evidentes (dia 21). Nesta altura, diversos parâmetros morfológicos e fisiológicos foram avaliados.

À semelhança do ensaio anterior foram preparadas 2 soluções, uma controlo que abastecia 100% das necessidades de azoto da planta (pH=6 e CE= 2,3 dS/m), e outra que abastecia 50% (pH=6 e CE= 2,1 dS/m). As plantas, dos dois genótipos, foram divididas em quatro tratamentos cada um com n=9 (Fig.6).

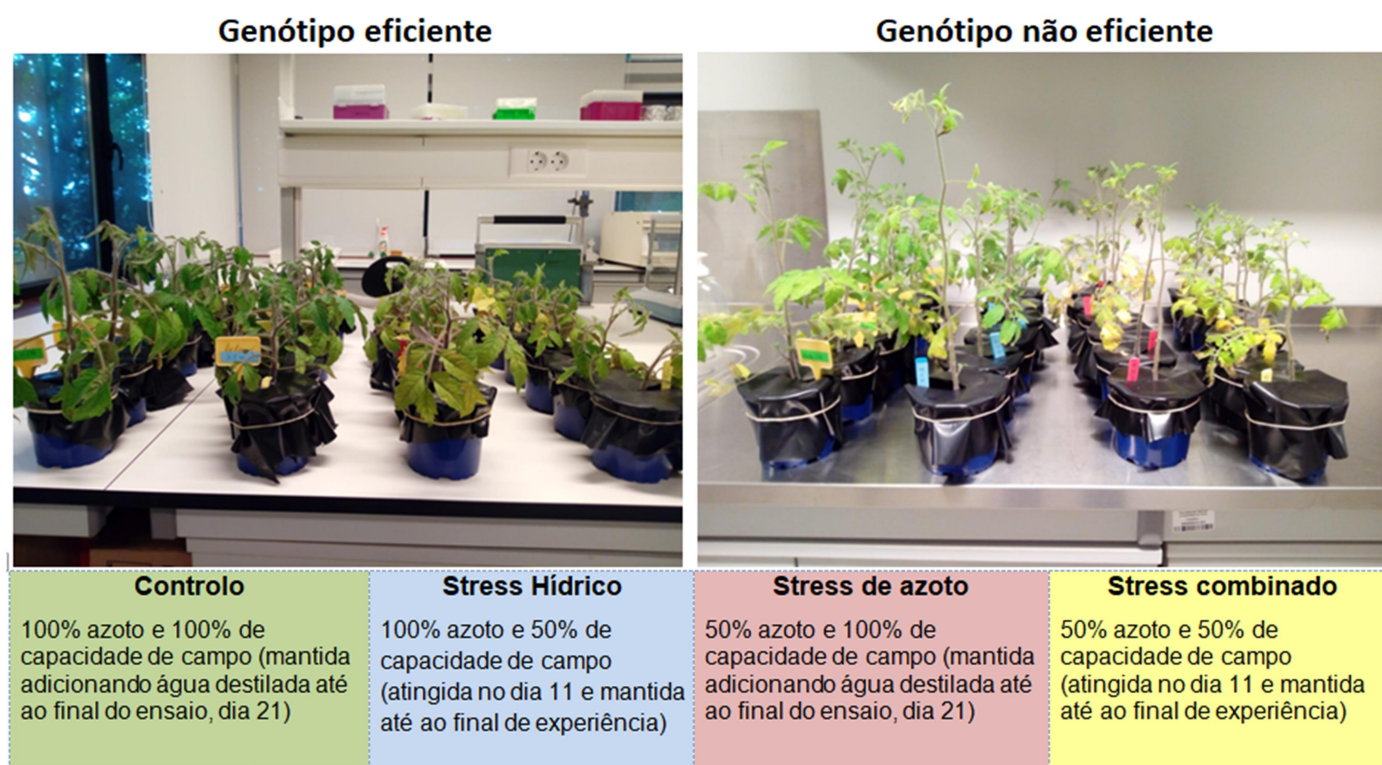


Figura 6. Descrição esquemática dos quatro tratamentos aplicados a cada genótipo em estudo: 100% de azoto e 100% capacidade de campo (controlo/verde); 100% de azoto e 50% de água (stress hídrico/azul); 50% de azoto e 100% capacidade de campo (stress azoto/vermelho); 50% de azoto e 50% capacidade de campo (stress combinado/amarelo).

3.2.2. Avaliação dos parâmetros morfológicos

No final da experiência foram pesados os vasos para determinação da quantidade de água consumida pelas plantas ao longo da experiência. As plantas

foram recolhidas e lavadas, e o comprimento raízes e altura das plantas foram determinados. Seguidamente, a parte aérea foi separada em caule e folhas, tendo sido contado o nº de folhas e determinada a sua área foliar (LI3100 (Li-cor, USA). O peso fresco das raízes, caule e folhas foi também registado, seguido do peso seco após secagem numa estufa ventilada (Binder), nas mesmas condições da exp. 1.

Para obtenção de outros indicadores morfológicos as seguintes equações da secção 3.1.3.2 (equação 2,3,4 e 5) foram aplicadas.

3.2.3. Avaliação dos parâmetros fisiológicos

3.2.3.1. SPAD

No dia 21 do ensaio, foram recolhidos os teores de clorofila/índices SPAD (SPAD 502 plus Konica Minolta, Japão) em leituras obtidas em triplicado na folha mais jovem totalmente desenvolvida de cada planta (n= 72).

3.2.3.2. Eficiência do Uso da água

Tendo em consideração a biomassa produzida pela planta e a água consumida ao longo do ensaio as equações mencionadas na secção 3.1.3.2 (equações 6 e 7) foram aplicadas para determinação da eficiência do uso de água pelas plantas e consumo de água em função da área foliar.

3.2.4. Análise estatística

Na análise estatística usou-se o programa IBM SPSS Statistics 26. As médias foram comparadas entre tratamentos recorrendo-se à ANOVA a um fator, em que as diferenças (caso existam) foram detetadas usando o teste de efeitos entre sujeitos e o teste de Tukey, com um $p \leq 0,05$. Já entre genótipos submetidos ao mesmo tratamento as diferenças foram analisadas recorrendo-se a “T-Tests”, e aceites como significativas para um $p \leq 0,05$.

4. Resultados e discussão

4.1. Efeitos da aplicação do BlueN® nas respostas da planta

4.1.1. Parâmetros morfológicos

Para a avaliação da eficiência do biostimulante Blue N® na mitigação dos efeitos adversos do stress combinado de água e azoto em plantas de tomate, foram realizadas diferentes medições biométricas diretas (comprimento da parte aérea e raiz, biomassa fresca e seca da raiz, caule e folhas, número de folhas e área foliar) e indiretas (proporção do peso seco entre folha e planta e entre a parte aérea e raiz, área foliar específica e proporção de área foliar das plantas).

Selim e El-Nady (2011) demonstraram que consoante a intensidade do stress hídrico a quantidade de biomassa nos diferentes tecidos era distinta. Stresses moderados (80% capacidade de campo) proporcionavam melhores performances nos peso seco de raiz, caule, folhas e total do tomateiro em comparação com um controlo (100% capacidade de campo). Contudo, o total oposto ocorreu com stresses mais elevados e críticos (60% e 40% capacidade de campo). Sousa (2019) demonstrou resultados semelhantes para os stresses de azoto e combinado (hídrico e de azoto) na cultivar de tomate “Micro-Tom”.

Observando o peso seco total das plantas (Fig. 7A), não se verificou efeito significativo entre os tratamentos controlo ($p = 0,217$) e entre os tratamentos de stress combinado ($p = 0,109$). No entanto é importante referir que a média de peso seco total no tratamento com BlueN® foi superior para o tratamento de stress combinado (+16,7%). Mesmo que não haja diferenças significativas os piores resultados nos pesos totais nos tratamentos de stress combinado sem BlueN® são um ponto a favor dos efeitos atenuantes do produto. O crescimento vegetativo/peso da planta é gravemente afetado pelo stress hídrico (Kramer, 1963; Pervez *et al.*, 2009) e de azoto (Ciompi *et al.*, 1996; Okunlola *et al.*, 2015). Desta forma, o BlueN® contribuiu para uma maior produção de biomassa total na planta em particular para o stress combinado. Não ocorrendo o mesmo no tratamento controlo pois, tal como Basal e Szabó (2020) defenderam, a elevada disponibilidade de azoto não é recomendada com a ausência de seca, pois diminui a performance da planta em alguns parâmetros.

Relativamente ao peso seco das folhas das plantas (Fig. 7B), não se verificou efeito significativo entre os tratamentos controlo ($p = 0,164$) e entre os tratamentos de stress combinado ($p = 0,312$). Devendo-se talvez ao facto serem necessárias mais

aplicações de BlueN® ou do produto necessitar de mais tempo para surtir efeito na folha.

No peso seco do caule das plantas (Fig. 7C), verificou-se efeito significativo entre os tratamentos controlo ($p = 0,048$), mas não entre os tratamentos de stress combinado ($p = 0,276$). Contudo é importante referir que a média de peso seco do caule no tratamento com BlueN® foi inferior para o tratamento controlo (-16,2%) e superior para o tratamento de stress combinado (+14,5%). Desta forma, é fundamental refletir sobre o facto de as médias de peso seco do caule no tratamentos com BlueN® serem superiores. Como McCauley *et al.* (2009) referem, a existência de caules menos vigorosos e mais delgados é provocada pelo stress de azoto, e como Jaleel *et al.* (2009) o peso seco diminui com o stress hídrico.

Quanto ao peso seco da raiz das plantas (Fig. 7D), não se verificou efeito significativo entre os tratamentos controlo ($p = 0,808$), mas sim entre os tratamentos de stress combinado ($p = 0,043$). É imperativo referir que a média de peso seco da raiz nos tratamentos com BlueN® foram superiores para o tratamento de stress combinado (+27,6%). Como referido anteriormente o défice hídrico leva a perdas no crescimento radicular em algumas espécies (Jaleel *et al.*, 2009) como é o caso do tomate (Khan *et al.*, 2015). Este facto é também demonstrado por Eghball e Maranville (1993) que relacionaram a disponibilidade do azoto no solo com o stress hídrico sugerindo que, para stresses elevados de água, o peso seco da raiz registava médias inferiores. Caso o stress hídrico sentido seja elevado o BlueN® pode melhorar a performance da raiz, ajudando-a a desenvolver uma melhor estrutura e a combater os efeitos negativos provocados.

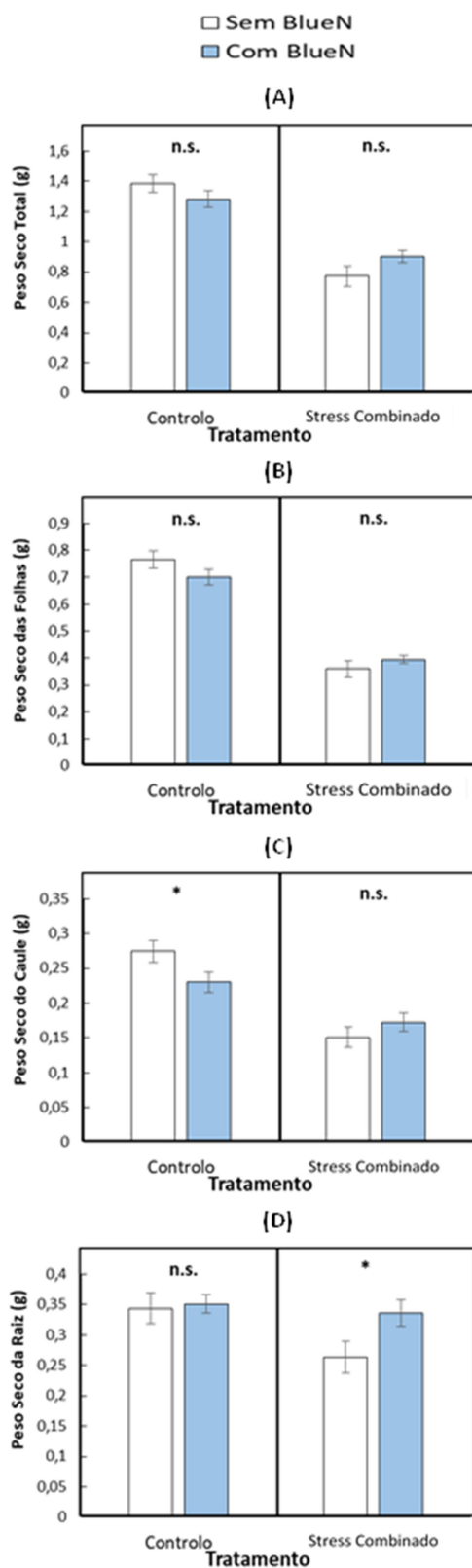


Figura 7. Peso seco total (A), das folhas (B), caule (C) e raiz (D) dos tomateiros para os tratamentos com 100% de azoto e 100% capacidade de campo (controlo) e 50% de azoto e 50% capacidade de campo (stress combinado), com e sem BlueN®. Os valores representados correspondem à média de doze réplicas e as barras o respetivo erro padrão. Estando marcados com n.s. os tratamentos que não registaram significância entre si e com * os que têm diferenças significativas ($p \leq 0,05$). A análise estatística dos dois tratamentos foi feita de forma independente.

Nahar e Gretzmacher (2011) avaliaram o comprimento da raiz, em conjunto com o peso seco, pois este parâmetro reflete o nível de stress sentido e a resposta da planta a esse stress. Abenavoli *et al.* (2016) referem que certas plantas tendem a aumentar o alongamento radicular na tentativa de lidar com o stress de azoto, e Nahar e Gretzmacher (2011) referem que esta adaptação permite uma maior facilidade de abordar o stress hídrico, permitindo a absorção de água a maiores profundidades. No nosso estudo, no comprimento da raiz não se verificou um efeito significativo da aplicação de Blue N® entre os tratamentos controlo ($p = 0,612$) e entre os tratamentos sujeitos a stress combinado ($p = 0,459$) (Fig. 8A).

O crescimento da parte aérea de uma planta pode ser bastante influenciado por potenciais hídricos baixos, uma consequência direta do stress hídrico (Sharp, 2002), e pelo azoto prontamente disponível, a disponibilidade do elemento no solo e a capacidade da planta em o absorver (Chun *et al.*, 2005). Na altura da planta (comprimento da parte aérea das plantas) (Fig. 8B), não se verificou efeito significativo entre os tratamentos controlo ($p = 0,052$) e entre os tratamentos de stress combinado ($p = 1,000$). Pervez *et al.* (2009) demonstrou, na cultivar “MoneyMaker”, que o stress hídrico no tomateiro contribui para uma menor altura da planta, assim como o stress de azoto (Okunlola *et al.*, 2015). Além disso, era expectável que o BlueN® atenuasse os efeitos do stress combinado, o que não ocorreu.

O facto de não haver diferenças significativas, tanto no comprimento da raiz como altura da planta, pode-se dever à dosagem e a altura de aplicação do bioestimulante não serem as ideais para se traduzir numa melhor performance da planta.

O stress hídrico pode ter grandes impactos no crescimento e desenvolvimento da planta devido especificamente à redução do potencial hídrico (Nonami, 1998; Selim & El-Nady, 2011). O tomate tem tendência a alocar mais recursos na raiz do que na parte aérea com a falta de água (Moles *et al.*, 2018; Nahar & Gretzmacher, 2011), algo semelhante ocorre com o stress de azoto, a disponibilidade do elemento dita para onde este é mobilizado (Zhao *et al.*, 2005). Contudo, o autor demonstrou que só para stresses elevados de azoto é que se notava diferenças significativas no crescimento da planta. Da mesma forma que é possível confirmar uma deslocação dos recursos da parte aérea para a raiz com o aumentar da intensidade dos stresses, seria imperativo verificar de que maneira essas alterações morfológicas alteram a planta como um todo.

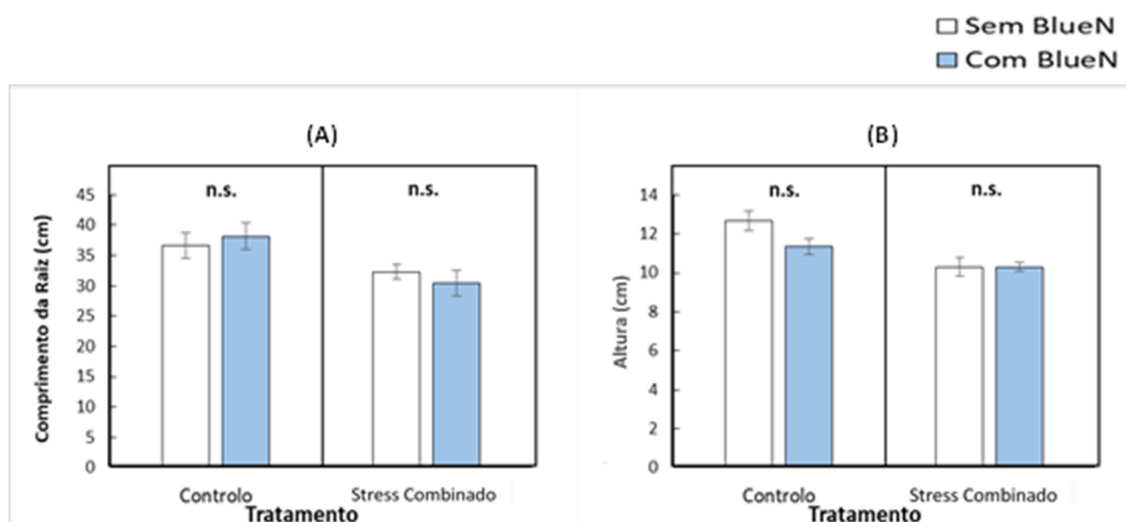


Figura 8. Comprimento da raiz (A) e altura (B) dos tomateiros para os tratamentos com 100% de azoto e 100% capacidade de campo (controlo) e 50% de azoto e 50% capacidade de campo (stress combinado), com e sem BlueN®. Os valores representados correspondem à média de doze réplicas e as barras o respetivo erro padrão. Estando marcados com n.s. os tratamentos que não registaram significância entre si e com * os que têm diferenças significativas ($p \leq 0,05$). A análise estatística dos dois tratamentos foi feita de forma independente.

Um fornecimento adequado de azoto aumenta a síntese de proteínas, permitindo que a planta cresça mais depressa, aumentando o seu metabolismo, a divisão celular, o alongamento celular e, assim, estimulando o crescimento apical, bem como a formação de folhas (Okunlola *et al.*, 2015). O mesmo autor demonstrou uma relação linear entre o aumento do número de folhas e a disponibilidade de azoto prontamente utilizável pela planta. No número de folhas das plantas testadas (Fig. 9), não se verificou efeito significativo entre os tratamentos controlo ($p = 0,114$) e entre os tratamentos de stress combinado ($p = 1,000$). De acordo com informação obtida de Ciompi *et al.* (1996) o défice de azoto limita o número de folhas e de Pervez *et al.* (2009) existe um decréscimo significativo do número de folhas do tomate aquando da carência de água. O BlueN® aumentou a disponibilidade de azoto nas condições ideais da planta, permitindo um maior número de folhas no tratamento controlo.

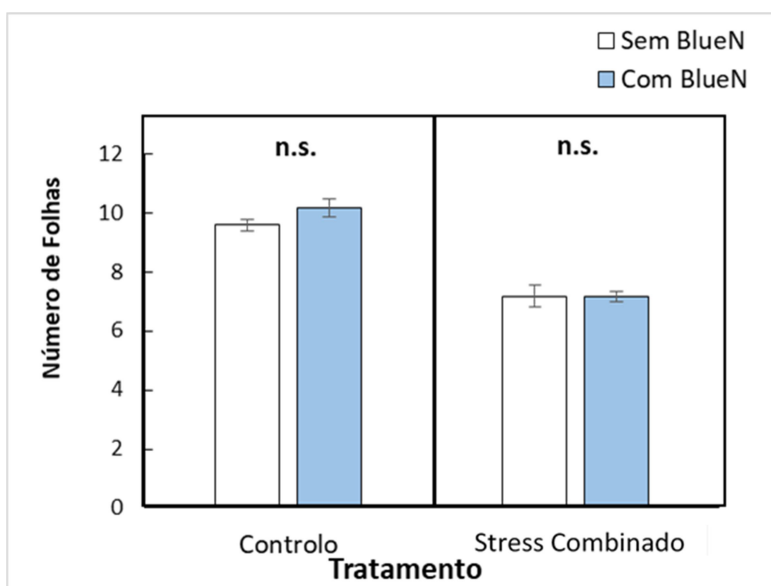


Figura 9. Número de folhas dos tomateiros para os tratamentos com 100% de azoto e 100% capacidade de campo (controlo) e 50% de azoto e 50% capacidade de campo (stress combinado), com e sem BlueN®. Os valores representados correspondem à média de doze réplicas e as barras o respetivo erro padrão. Estando marcados com n.s. os tratamentos que não registaram significância entre si e com * os que têm diferenças significativas ($p \leq 0,05$). A análise estatística dos dois tratamentos foi feita de forma independente.

O desenvolvimento de uma área foliar ideal é de extrema importância para a fotossíntese e, consequentemente, para o crescimento das plantas, sendo das principais características afetadas pelo stress hídrico que limita a produtividade da cultura (Machado *et al.*, 2021). Na área foliar das plantas (Fig.10), não se verificou efeito significativo entre os tratamentos controlo ($p = 0,827$) e entre os tratamentos de stress combinado ($p = 0,605$). A área foliar da planta reduz em stress hídrico (Jaleel *et al.*, 2009; Kramer, 1963) e de azoto (Okunlola *et al.*, 2015), com ou sem BlueN® foi semelhante. Contudo, esta afirmação poderá estar dependente do grau de severidade do stress sentido, isto é, com défices hídricos ligeiros existe uma maior expansão foliar (Pimentel, 2004; Sinclair & Ludlow, 1986).

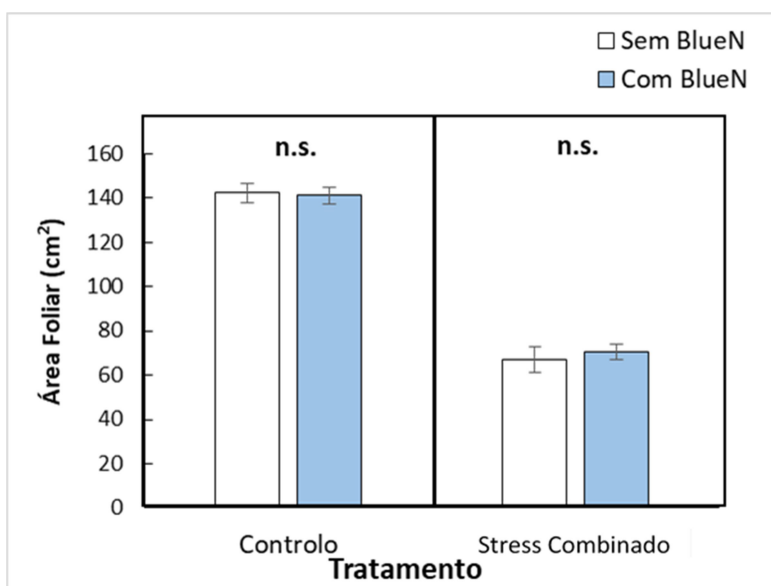


Figura 10. Área foliar dos tomateiros para os tratamentos com 100% de azoto e 100% capacidade de campo (controlo) e 50% de azoto e 50% capacidade de campo (stress combinado), com e sem BlueN®. Os valores representados correspondem à média de doze réplicas e as barras o respetivo erro padrão. Estando marcados com n.s. os tratamentos que não registaram significância entre si e com * os que têm diferenças significativas ($p \leq 0,05$). A análise estatística dos dois tratamentos foi feita de forma independente.

De entre vários outros parâmetros morfológicos Selim e El-Nady (2011) estudaram o rácio entre o peso seco das folhas e planta pois este trata-se de um parâmetro de crescimento de elevada importância. Como referido anteriormente, os stresses de água e azoto resultam numa alocação da biomassa da folha para a raiz, na tentativa de lidar com potenciais efeitos negativos e como tal o rácio será influenciado. Na proporção do peso seco entre folhas e plantas em estudo (Fig. 11), não se verificou efeito significativo entre os tratamentos controlo ($p = 0,613$) e entre os tratamentos de stress combinado ($p = 0,090$). Um maior desenvolvimento da folha, poderia ser reflexo da maior disponibilidade de recursos, que se irá refletir numa maior proporção de peso seco entre folhas e planta, contudo, como foi demonstrado o BlueN® contribuiu para uma maior produção de biomassa em toda a planta em particular na raiz, ajudando a planta a aumentar o seu poder de absorção e a lidar com ambos os stresses.

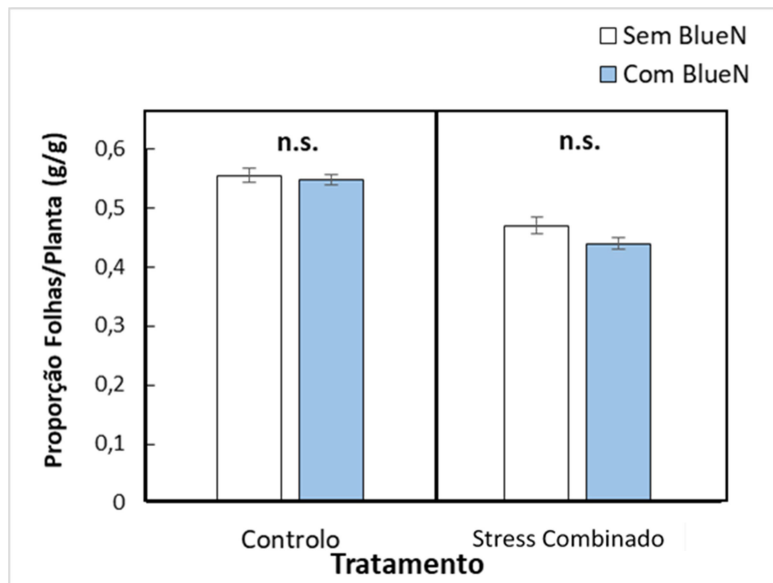


Figura 11. Proporção do peso seco entre folhas e planta dos tomateiros para os tratamentos com 100% de azoto e 100% capacidade de campo (controlo) e 50% de azoto e 50% capacidade de campo (stress combinado), com e sem BlueN®. Os valores representados correspondem à média de doze réplicas e as barras o respetivo erro padrão. Estando marcados com n.s. os tratamentos que não registaram significância entre si e com * os que têm diferenças significativas ($p \leq 0,05$). A análise estatística dos dois tratamentos foi feita de forma independente.

Se houver limitada quantidade de azoto disponível no solo a planta aloca mais recursos na raiz do que na parte aérea, melhorando a sua estrutura e comprimento, caso a raiz seja mais comprida há maior capacidade de absorção de água e consequentemente mais tolerância à baixa disponibilidade de água (Eghball & Maranville, 1993). Na proporção do peso seco entre parte aérea e raiz das plantas estudadas (Fig. 12), verificou-se efeito significativo entre os tratamentos controlo ($p = 0,030$), mas não entre os tratamentos de stress combinado ($p = 0,051$). A média da proporção nos tratamentos com BlueN® foi inferior para o tratamento controlo (-15,6%) e para o tratamento stress combinado (-14,4%). Como referido por Kramer (1963) a proporção parte aérea/raiz é mais reduzida com stress hídrico, sendo reflexo de um maior investimento no desenvolvimento da raiz em detrimento da parte aérea. Neste estudo, tendo em conta que o BlueN® contribuiu para uma maior produção de biomassa, especialmente na raiz, ajudando a planta a aumentar o seu poder de absorção e a lidar com ambos os stresses, isso refletiu-se numa diminuição da proporção avaliada.

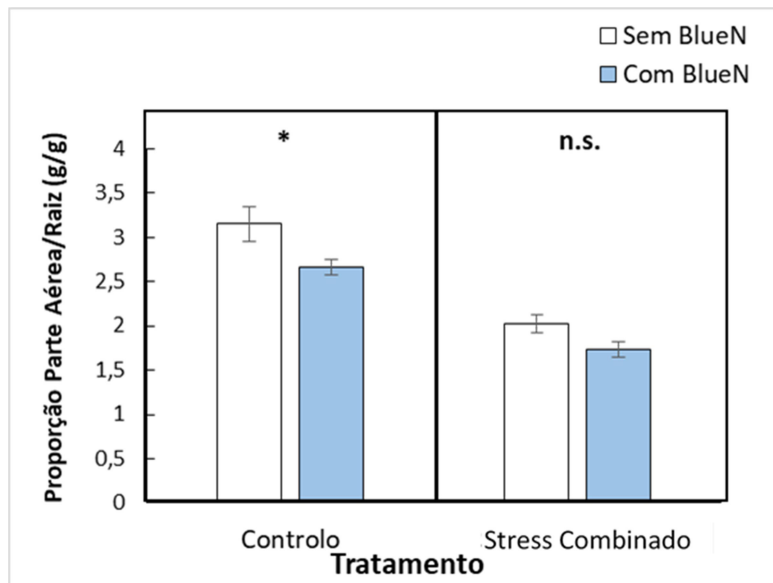


Figura 12. Proporção do peso seco entre parte aérea e raiz dos tomateiros para os tratamentos com 100% de azoto e 100% capacidade de campo (controlo) e 50% de azoto e 50% capacidade de campo (stress combinado), com e sem BlueN®. Os valores representados correspondem à média de doze réplicas e as barras o respetivo erro padrão. Estando marcados com n.s. os tratamentos que não registaram significância entre si e com * os que têm diferenças significativas ($p \leq 0,05$). A análise estatística dos dois tratamentos foi feita de forma independente.

Estudos sugerem que a redução da área foliar específica é uma estratégia para lidar com o stress hídrico, pois folhas mais grossas geralmente têm um maior teor de clorofila e proteína, apresentando assim uma maior capacidade fotossintética e, portanto, uma maior produção de biomassa (Machado *et al.*, 2021). Quanto à área foliar específica calculada (Fig. 13), verificou-se efeito significativo entre os tratamentos controlo ($p = 0,039$), mas não entre os tratamentos de stress combinado ($p = 0,563$). A média da área foliar nos tratamentos com BlueN® foi superior para o tratamento controlo (+8,5%). Estes resultados podem querer dizer que o produto melhora a performance da planta no tratamento controlo, mas que a dosagem ou altura da aplicação podem não ter sido as ideais para surtir um efeito significativo no stress combinado, apesar de existir uma tendência para a diminuição da área foliar específica. Isto é, sabe-se que aquando do stress hídrico é aumentada a cutinização a lenhificação e a espessura da folha (Kramer, 1963), que poderá contribuir para um peso superior da folha, e diminuída a área foliar (Kramer, 1963) agravada ainda pelo stress de azoto (Okunlola *et al.*, 2015). Sendo a área foliar específica a razão entre a área foliar e o peso seco da folha, o seu valor deveria diminuir como resposta aos stresses impostos, em especial o da água.

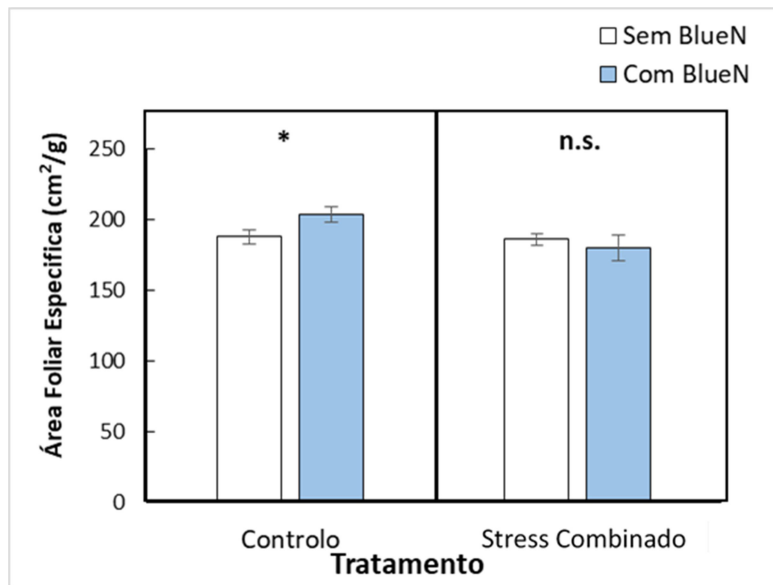


Figura 13. Área foliar específica dos tomateiros para os tratamentos com 100% de azoto e 100% capacidade de campo (controlo) e 50% de azoto e 50% capacidade de campo (stress combinado), com e sem BlueN®. Os valores representados correspondem à média de doze réplicas e as barras o respetivo erro padrão. Estando marcados com n.s. os tratamentos que não registaram significância entre si e com * os que têm diferenças significativas ($p \leq 0,05$). A análise estatística dos dois tratamentos foi feita de forma independente.

Como sugerido anteriormente por Machado *et al.* (2021), o desenvolvimento de uma área foliar ideal é de extrema importância para a fotossíntese. A fotossíntese será gravemente afetada pela falta de água (Khan *et al.*, 2015) e falta de azoto (Gould, 2013), sendo toda a produção de fotoassimilados e acumulação de biomassa comprometidas. Um possível indicador para o estado da planta e manutenção das relações “source-sink”, importante em plantas adaptadas/tolerantes aos stresses (Moles *et al.*, 2018), é a proporção de área foliar pelo peso seco das plantas. Em relação à proporção de área foliar pelo peso seco das plantas (Fig. 14), não se verificou efeito significativo entre os tratamentos controlo ($p = 0,108$) e entre os tratamentos de stress combinado ($p = 0,158$). Sugerindo mais uma vez que o “timing” ou frequência de aplicação podem não ter sido os ideais para o produto demonstrar o efeito desejado.

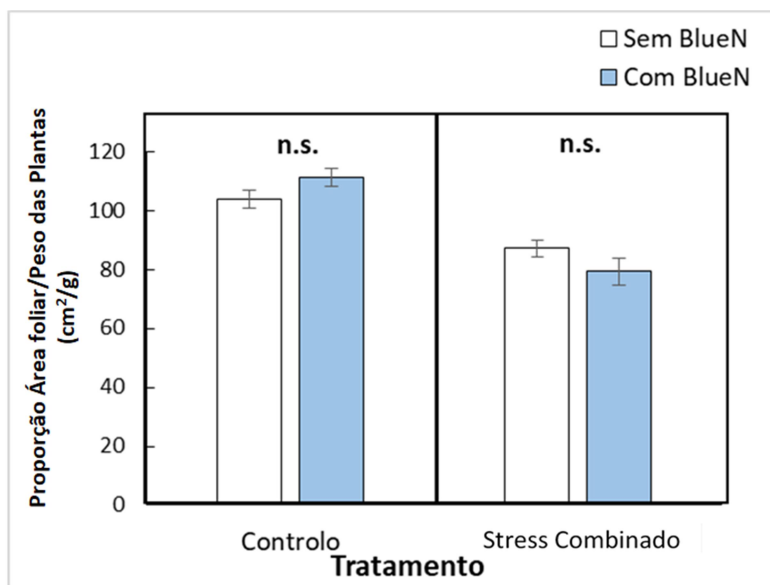


Figura 14. Proporção de área foliar pelo peso seco dos tomateiros para os tratamentos com 100% de azoto e 100% capacidade de campo (controlo) e 50% de azoto e 50% capacidade de campo (stress combinado), com e sem BlueN®. Os valores representados correspondem à média de doze réplicas e as barras o respetivo erro padrão. Estando marcados com n.s. os tratamentos que não registaram significância entre si e com * os que têm diferenças significativas ($p \leq 0,05$). A análise estatística dos dois tratamentos foi feita de forma independente.

4.1.2. Parâmetros fisiológicos

Além dos parâmetros morfológicos referentes a medições biométricas diretas e indiretas, para a avaliação da eficiência do biostimulante Blue N® na mitigação dos efeitos adversos do stress combinado de água e azoto em plantas de tomate, foram ainda estudados diversos parâmetros fisiológicos (teor de clorofila - SPAD, eficiência do uso de água e o consumo de água por área foliar).

4.1.2.1. SPAD

O índice SPAD pode ser usado no prognóstico da produtividade da planta, sendo um método não destrutivo para a avaliação do teor de clorofilas (Gil *et al.*, 2002). Um maior teor de clorofila e proteína remetem para uma maior capacidade fotossintética e, portanto, uma maior produção de biomassa (Machado *et al.*, 2021). No teor de clorofila (SPAD) das folhas das plantas avaliadas (Fig. 15), não se verificou efeito significativo entre os tratamentos controlo ($p = 0,873$) e entre os tratamentos de stress combinado ($p = 0,453$). O azoto é constituinte da clorofila e, por isso, o seu défice traduz-se geralmente em teores inferiores, sendo então o SPAD, uma ferramenta útil para avaliar a necessidade de azoto da planta (Law *et al.*, 2014). O stress hídrico também deverá contribuir para uma redução desses teores de clorofila

(Jaleel *et al.*, 2009). Mais uma vez, a falta de resultados significativos com a aplicação do BlueN®, pode remeter para uma dosagem/altura de aplicação impróprias.

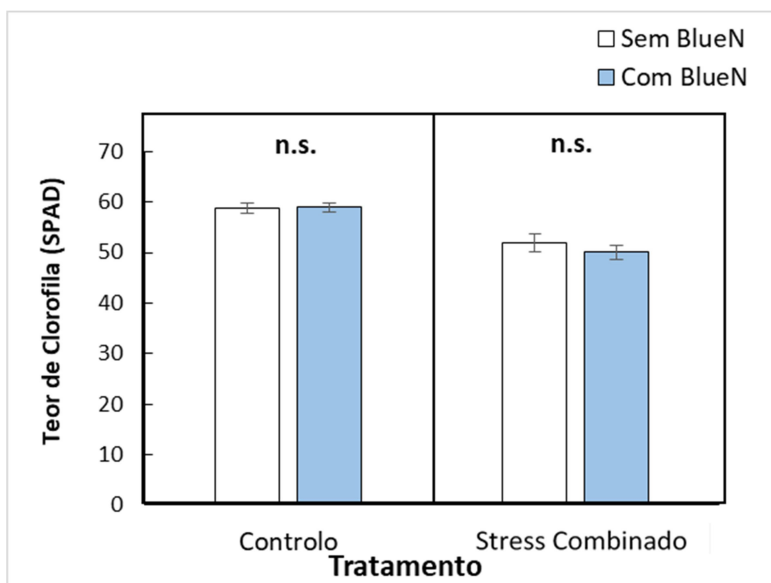


Figura 15. Teor de clorofila (SPAD) das folhas dos tomateiros para os tratamentos com 100% de azoto e 100% capacidade de campo (controlo) e 50% de azoto e 50% capacidade de campo (stress combinado), com e sem BlueN®. Os valores representados correspondem à média de doze réplicas e as barras o respetivo erro padrão. Estando marcados com n.s. os tratamentos que não registaram significância entre si e com * os que têm diferenças significativas ($p \leq 0,05$). A análise estatística dos dois tratamentos foi feita de forma independente.

4.1.2.2. Eficiência do uso de água

A eficiência do uso de água é um parâmetro fisiológico direto de extrema importância para este estudo, permitindo verificar até que ponto o BlueN® é uma estratégia eficaz na redução do uso de água e azoto no tomate, sem que este perca performance. Este parâmetro pode ser avaliado tendo em conta o de consumo de água em função da área foliar, visto que a área foliar ideal é um ponto a favor para uma fotossíntese eficiente e para todo o crescimento/funcionamento da planta. Um fornecimento adequado de azoto em condições de seca aumenta a disponibilidade de ácido indolacético que contribui para adaptações no xilema, disponibilizando também em maior quantidade o ácido abscísico na folha, responsável pelo melhor regulamento dos estomas e maior eficiência no uso de água (Song *et al.*, 2019). Na eficiência do uso de água das plantas avaliadas (Fig. 16), não se verificou efeito significativo entre os tratamentos controlo ($p = 0,134$) e entre os tratamentos de stress combinado ($p = 0,071$). Não foi possível demonstrar o potencial deste bioestimulante em promover um melhor uso de água nestas condições adversas, talvez se a duração do ensaio fosse superior o benefício do produto fosse evidente.

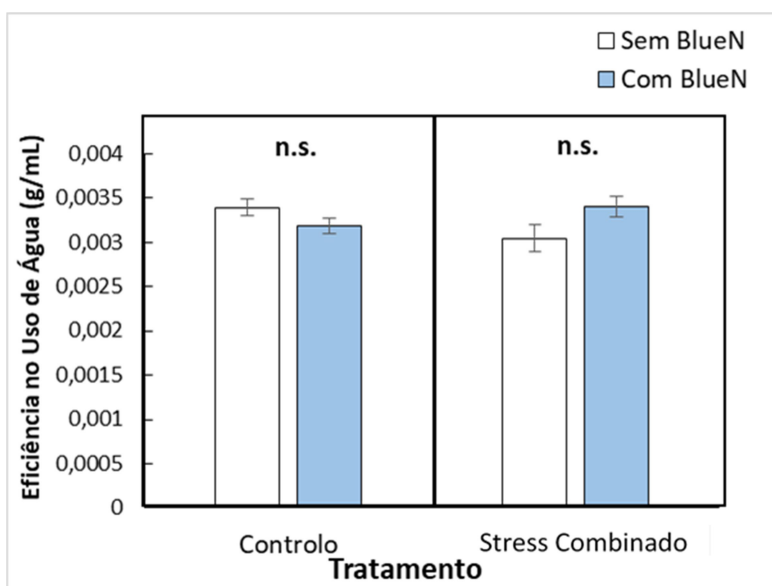


Figura 16. Eficiência do uso de água dos tomateiros para os tratamentos com 100% de azoto e 100% capacidade de campo (controlo) e 50% de azoto e 50% capacidade de campo (stress combinado), com e sem BlueN®. Os valores representados correspondem à média de doze réplicas e as barras o respetivo erro padrão. Estando marcados com n.s. os tratamentos que não registaram significância entre si e com * os que têm diferenças significativas ($p \leq 0,05$). A análise estatística dos dois tratamentos foi feita de forma independente.

Por último, quanto ao consumo de água em função da área foliar das plantas (Fig. 17), também não se verificou efeito significativo entre os tratamentos controlo ($p = 0,747$) e entre os tratamentos de stress combinado ($p = 0,837$). A ausência de resultados significativos com a aplicação do BlueN®, pode remeter mais uma vez para uma aplicação imprópria do bioestimulante.

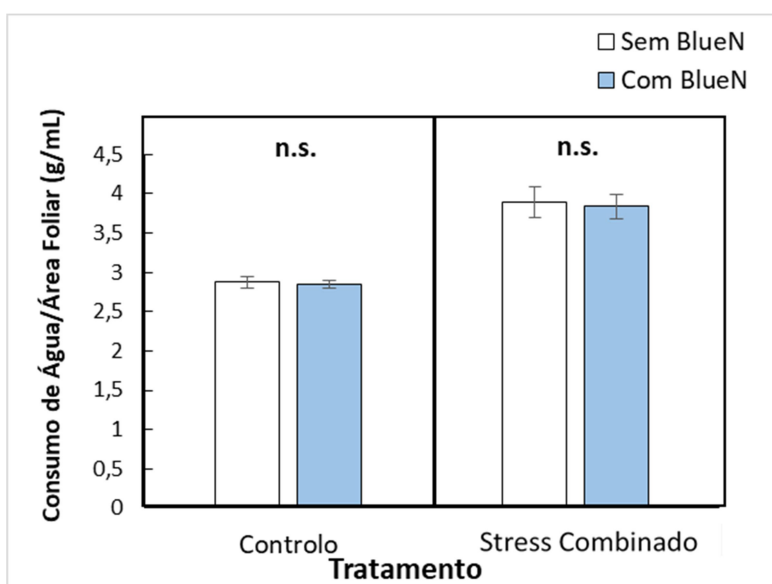


Figura 17. Consumo de água em função da área foliar dos tomateiros para os tratamentos com 100% de azoto e 100% capacidade de campo (controlo) e 50% de azoto e 50% capacidade de campo (stress combinado), com e sem BlueN®. Os valores representados correspondem à média de doze réplicas e as barras o respetivo erro padrão. Estando marcados com n.s. os tratamentos que não registaram significância entre si e com * os que têm diferenças significativas ($p \leq 0,05$). A análise estatística dos dois tratamentos foi feita de forma independente.

4.2. Avaliação da resposta de genótipos contrastantes de tomate ao stress hídrico e de azoto

4.2.1. Parâmetros morfológicos

Na experiência dos genótipos contrastantes (Exp. 2), que teve como objetivo aferir mecanismos morfo-fisiológicos responsáveis pelo comportamento adaptativo face a stress hídrico, de azoto e combinado de água e azoto, foram realizadas diferentes medições biométricas diretas (comprimento da parte aérea e raiz, biomassa fresca e seca da raiz, caule e folhas, número de folhas e área foliar) e indiretas (proporção do peso seco entre folha e planta e entre a parte aérea e raiz, área foliar específica e proporção de área foliar das plantas).

É possível verificar diferentes mecanismos adaptativos entre cultivares de tomate. Isto é, algumas variedades desenvolvem a plasticidade ao stress mantendo o peso seco total da planta através de um maior desenvolvimento na estrutura, densidade, comprimento e peso da raiz, mobilizando as reservas para essa área (Moles *et al.*, 2018). Enquanto outras sintetizam e acumulam açúcares osmoprotetores, prolina e outras substâncias em pontos fulcrais dos tecidos, regulando o potencial osmótico, promovendo um melhor uso da água e CO₂, e uma fotossíntese mais eficiente, sem evitar a transpiração, o que resulta em maiores médias de peso seco da parte aérea, área foliar e comprimento da parte aérea, nos tratamentos de stress. Desta forma, é imperativo estudar todas as partes da planta e a planta como um todo, de modo a poder escolher um genótipo modelo tolerante ao stress imposto.

Referentemente ao peso seco total das plantas (Fig. 18A), verificou-se efeito significativo entre tratamentos no genótipo eficiente ($p = 0,000$) e no não eficiente ($p = 0,000$). Para além do mais, verificou-se entre genótipos no tratamento de stress de azoto ($p = 0,000$), mas não no tratamento controlo ($p = 0,177$), tratamento de stress hídrico ($p = 0,573$) e tratamento de stress combinado ($p = 0,832$). O genótipo eficiente teve médias de peso seco total das plantas superiores para o tratamento controlo (+18%) e tratamento de stress de azoto (+48,5%). Os resultados demonstram que, aquando do stress de azoto, as plantas tendem a perder biomassa, como observado por Okunlola *et al.* (2015) e Pervez *et al.* (2009). Devido ao efeito mais severo do stress de azoto, este tratamento parece ter influenciado mais o stress combinado. Tendo em conta as diferenças entre genótipos, apesar do genótipo eficiente ter médias de biomassa total superiores às do genótipo não eficiente, o primeiro

conseguiu obter menos perdas neste parâmetro aquando do stress de azoto, demonstrando assim um comportamento mais tolerante face a este stress.

Referente ao peso seco das folhas das plantas (Fig. 18B), verificou-se efeito significativo entre tratamentos no genótipo eficiente ($p = 0,000$) e no não eficiente ($p = 0,000$). Contudo, não se verificou entre genótipos no tratamento controlo ($p=0,106$), tratamento de stress hídrico ($p = 0,121$) e tratamento de stress combinado ($p = 0,116$), mas sim no tratamento de stress de azoto ($p = 0,000$). Mesmo assim, o genótipo eficiente teve médias de peso seco das folhas superiores para o tratamento controlo (+20,8%), tratamento de stress de azoto (+148,7%), tratamento de stress hídrico (+40,9%), e no tratamento stress combinado (+39,9%). Face aos resultados obtidos com o peso seco das folhas, é possível afirmar que o stress de azoto teve mais impacto nas folhas, sendo o fator com mais influência no stress combinado. As folhas desenvolveram-se mais, face ao mesmo stress de azoto para o genótipo eficiente. Ou seja, esta variedade pode conseguir uma área foliar superior, uma melhor fotossíntese e melhor produtividade da planta (Machado *et al.*, 2021).

Quanto ao peso seco do caule das plantas (Fig. 18C), verificou-se efeito significativo entre tratamentos no genótipo eficiente ($p = 0,000$) e no não eficiente ($p = 0,001$). Não se verificou diferenças significativas entre genótipos no tratamento controlo ($p=0,227$), tratamento de stress hídrico ($p = 0,160$) e tratamento de stress combinado ($p = 0,181$), todavia verificou-se no stress de azoto ($p = 0,034$). O genótipo eficiente teve médias de peso seco do caule superiores para o tratamento controlo (+18,5%) e tratamento de stress de azoto (+19,5%), e inferiores no tratamento de stress hídrico (-23%) e no tratamento stress combinado (-15%). Volta-se a confirmar que o stress de azoto teve mais impacto na planta e mais peso no stress combinado, em especial no genótipo não eficiente em que as médias dos dois tratamentos são semelhantes. É importante mencionar que o genótipo eficiente parece conseguir amenizar melhor o impacto sofrido pelo stress de azoto neste parâmetro, com médias significativamente superiores, mas não para o stress hídrico e stress combinado. Seria de esperar que o stress hídrico resultasse em pesos de caule inferiores, algo que ocorre em algumas espécies como a beterraba (Jaleel *et al.*, 2009), em especial no genótipo não eficiente, no entanto este refletiu-se mais no genótipo eficiente.

No peso seco da raiz das plantas (Fig. 18D), não se verificou efeito significativo entre tratamentos no genótipo eficiente ($p = 0,000$), mas não no não eficiente ($p = 0,093$). Para além do mais, não se verificou entre genótipos no tratamento controlo ($p=0,507$), tratamento de stress de azoto ($p = 0,226$), tratamento de stress hídrico ($p = 0,913$) e tratamento de stress combinado ($p = 0,137$). Mesmo assim, é imperativo

realçar que o genótipo eficiente teve médias de peso seco da raiz inferiores no tratamento stress combinado (-26,1%). Por estes dados de peso seco da raiz observa-se um comportamento semelhante entre tratamentos de stress. Comparativamente ao respetivo controlo, o genótipo eficiente parece ter perdido mais biomassa na raiz mas isto também pode ser devido ao facto de que ele investiu mais no comprimento e não tanto na robustez da raiz, algo que efetivamente se verificou no comprimento da raiz (Fig. 19A).

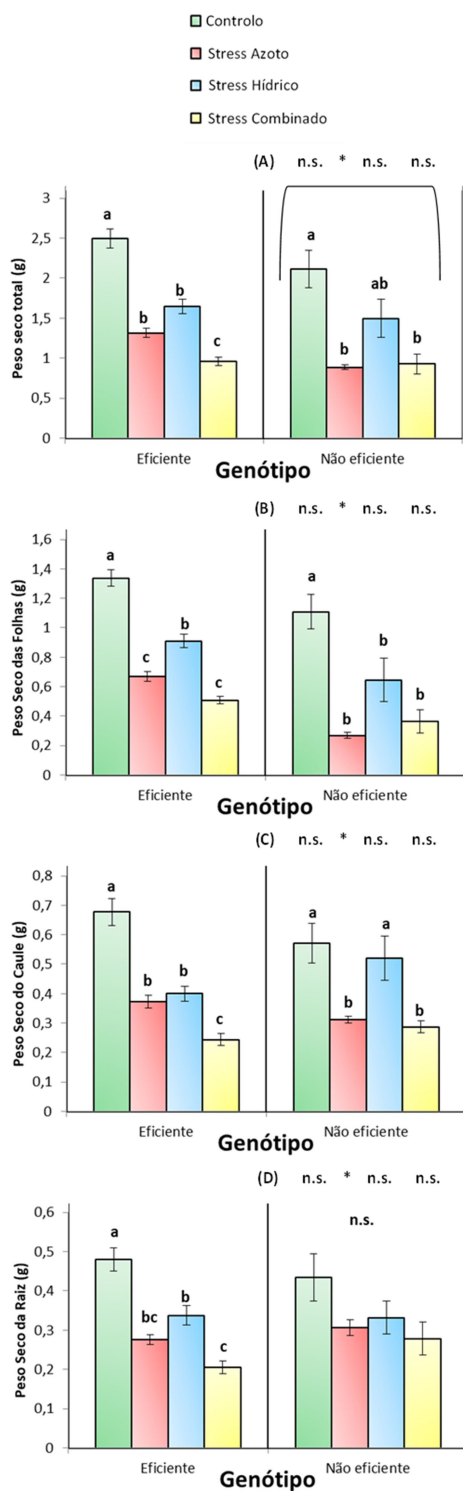


Figura 18. Peso seco total (A), da raiz (B), caule (C) e raiz (D) dos tomateiros para os tratamentos com 100% de azoto e 100% capacidade de campo (controlo/verde), 50% de azoto e 100% capacidade de campo (stress azoto/vermelho), 100% de azoto e 50% de capacidade de campo (stress hídrico/azul) 50% de azoto e 50% capacidade de campo (stress combinado/amarelo), para o genótipo eficiente e não eficiente. Os valores representados correspondem à média de seis réplicas e as barras o respetivo erro padrão. Letras diferentes são estatisticamente significativas a $p \leq 0,05$. Estando marcadas com n.s. as barras que não registaram significância entre os mesmos tratamentos, de genótipos diferentes, e com * as que têm diferenças significativas.

Nahar e Gretzmacher (2011) retratam que diferentes cultivares de tomate reagem de maneira diferente ao stress, que dentro da mesma planta os órgãos respondem de maneira desigual, e que mais especificamente dentro do mesmo órgão os parâmetros avaliados têm resultados distintos. Quanto ao comprimento da raiz das plantas avaliadas (Fig. 19A), verificou-se efeito significativo entre tratamentos no genótipo eficiente ($p = 0,028$) e no não eficiente ($p = 0,008$), contudo, não se verificaram diferenças entre genótipos nos diferentes tratamentos (controlo, $p=0,095$; stress de azoto, $p = 0,064$; stress hídrico; $p = 0,774$; stress combinado, $p = 0,984$). De qualquer forma, é importante referir que o genótipo eficiente teve médias de comprimentos de raiz inferiores para o tratamento controlo (-19,4%), tratamento de stress de azoto (-15,6%) e tamanho semelhante no stress hídrico e combinado, em comparação com o genótipo oposto. Razdan (2006), refere que um dos três mecanismos de sobrevivência a regiões com falta de água é o desenvolvimento de características particulares como raízes profundas ou reduzida área de transpiração. Neste estudo, as médias de comprimento da raiz são mais reduzidas no tratamento stress hídrico em relação ao tratamento controlo, em ambos os genótipos. Esta diminuição da biomassa da raiz após o stress hídrico já foi reportada para o tomateiro (Khan et al., 2015). Ressalta também o facto de as raízes nos tratamentos com carência de azoto, serem significativamente superiores ao stress de água. Este último ponto é a favor da cultivar eficiente pois neste genótipo não houveram diferenças significativas entre o tratamento controlo e os stresses, apenas entre o tratamento de stress de azoto e o hídrico. Isto quer dizer que o genótipo eficiente sofreu menos com os stresses impostos que o não-eficiente. Aquando do stress de azoto, a raiz primária tende a crescer, de modo a potenciar a capacidade de absorção e eficiência do uso do elemento, mas a biomassa da raiz tende a diminuir devido a uma menor iniciação de raízes adventícias (Liu *et al.*, 2020). No entanto, foi observado uma correlação entre maiores raízes e eficiência do uso de azoto em genótipos eficientes de tomate (Abenavoli et al., 2016). Se houver limitada quantidade de azoto disponível no solo a planta aloca mais recursos na raiz, melhorando a sua estrutura e comprimento, caso a raiz seja mais comprida há maior capacidade de absorção de água e consequentemente mais tolerância à baixa disponibilidade de água (Eghball & Maranville, 1993). Variedades mais tolerantes a stress hídrico (Nahar & Gretzmacher, 2011) e a stress de azoto (Abenavoli *et al.*, 2016) desenvolvem raízes mais profundas como mecanismo adaptativo ao stress. Por fim comparando os tratamentos controlo é imperativo referir que o genótipo eficiente tem raízes naturalmente mais curtas do que o não eficiente, mas no caso do tratamento stress hídrico e combinado as diferenças

não se fazem notar, ou seja a variedade eficiente perdeu menos comprimento com esses stresses referidos do que a variedade oposta.

Variedades sensíveis ao stress hídrico podem reduzir entre 50 a 60% da sua altura, enquanto variedades tolerantes têm tendência a perdas menores (Kamanga, 2020). Machado *et al.* (2021) acrescenta também que à medida que o stress de azoto se faz sentir na planta existe uma realocação de auxina da parte aérea para as raízes para o crescimento lateral da raiz, diminuindo a quantidade de auxina encontrado no meristema apical, e consequentemente afetando o desenvolvimento do caule. Desta forma, torna-se imperativo saber de que maneira é afetada a altura da planta, mas também da planta como um todo. Em relação à altura (Fig. 19B), verificou-se efeito significativo entre tratamentos no genótipo eficiente ($p = 0,001$) e no não eficiente ($p = 0,001$). Além disso, entre genótipos verificaram-se efeitos significativos em todos os tratamentos (controlo, $p=0,000$; stress de azoto, $p = 0,000$; stress hídrico, $p = 0,000$; stress combinado, $p = 0,000$). O genótipo eficiente teve médias de altura (comprimentos da parte aérea) inferiores ao genótipo oposto para o tratamento controlo (-37,5%), tratamento de stress de azoto (-45,6%), tratamento de stress hídrico (-50,8%), e tratamento stress combinado (-42,7%). A altura, em relação ao tratamento controlo, é inferior no tratamento de stress hídrico, como sugeriam Jaleel *et al.* (2009) que refere que em algumas espécies este stress afecta o comprimento do caule, além de Pervez *et al.* (2009) que o demonstraram em tomateiro, e é inferior também no stress de azoto, como sugerido por Okunlola *et al.* (2015). É importante reforçar que o genótipo não eficiente tem alturas de planta naturalmente superiores, algo visível através das diferenças no tratamento controlo entre eles, tanto uma cultivar como a outra podem ter um hábito de crescimento com poucas alterações ao stress, contudo, aquando do stress combinado de água e azoto, o genótipo não eficiente tem perdas mais abruptas. A falta de mais diferenças significativas, principalmente no stress hídrico, remete para um stress menos severo comparativamente ao stress de azoto.

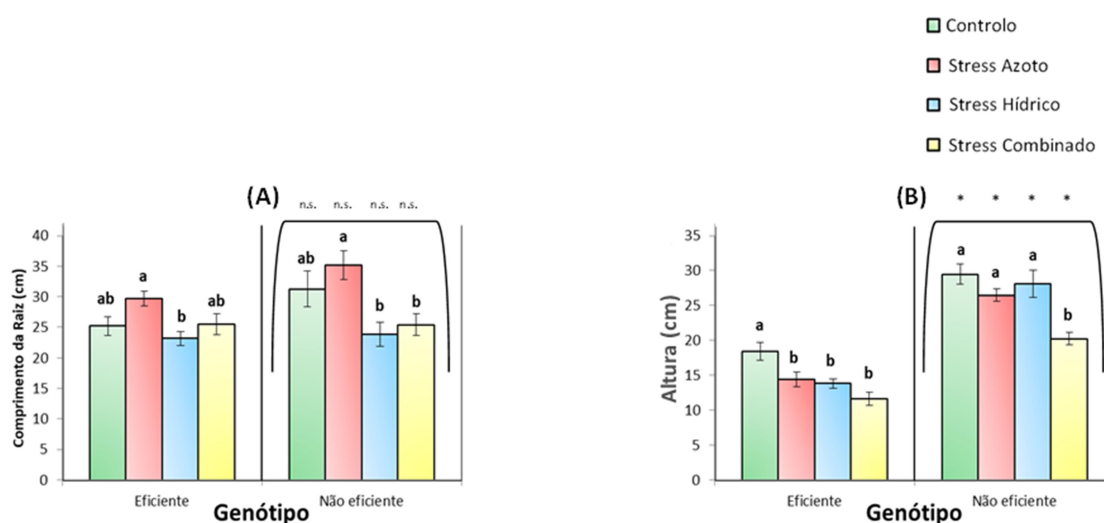


Figura 19. Comprimento da raiz (A) e altura (B) dos tomateiros para os tratamentos controlo (100% de azoto e 100% capacidade de campo; verde), stress de azoto (50% de azoto e 100% capacidade de campo; vermelho), stress hídrico (100% de azoto e 50% capacidade de campo; azul) e stress combinado (50% de azoto e 50% capacidade de campo; amarelo), para o genótipo eficiente e não eficiente. Os valores representados correspondem à média de seis réplicas e as barras o respetivo erro padrão. Letras diferentes são estatisticamente significativas a $p \leq 0,05$. Estando marcadas com n.s. as barras que não registaram significância entre os mesmos tratamentos, de genótipos diferentes, e com * as que têm diferenças significativas.

Morales *et al.* (2015) referiram que de entre os vários parâmetros morfológicos um dos melhores para uma seleção indireta de genótipos de tomateiro resistentes ao stress hídrico seria o número de folhas, demonstrando que essas plantas mais adaptadas têm poucas alterações nesse parâmetro, pois têm um hábito de crescimento determinado. Além disso, como já havia sido interpretado, um fornecimento adequado de azoto aumenta a síntese de proteínas, permitindo que a planta cresça mais depressa, aumentando o seu metabolismo, a divisão celular, o alongamento celular e, assim, estimulando o crescimento apical, bem como a formação de folhas (Okunlola *et al.*, 2015). Desta forma, a quantidade de folhas e a capacidade da planta em manter números semelhantes em stress de água, azoto e combinado constituem um indicador tanto do grau de stress sentido, como do grau de tolerância da planta. Geralmente, a carência de azoto e de água limita o número de folhas (Ciompi *et al.*, 1996; Okunlola *et al.*, 2015). Neste estudo, o número de folhas das plantas avaliadas (Fig. 20) apresentou efeito significativo entre tratamentos no genótipo eficiente ($p = 0,000$) e no não eficiente ($p = 0,000$), verificou-se também entre genótipos no tratamento controlo ($p = 0,004$) e tratamento de stress hídrico ($p = 0,009$), contudo, não ocorreu no tratamento de stress de azoto ($p = 0,872$) e tratamento de stress combinado ($p = 0,087$). De qualquer forma, é importante referir que o genótipo eficiente teve médias de número de folhas inferiores para o tratamento controlo (-42,4%), tratamento de stress hídrico (-32,6%), e no stress combinado (-22,6%).

Apesar de uma massa inferior, o genótipo não eficiente apresenta naturalmente um maior número de folhas. A semelhança no número de folhas no stress de azoto remete novamente para uma maior capacidade de adaptação do genótipo eficiente aquando do stress de azoto.

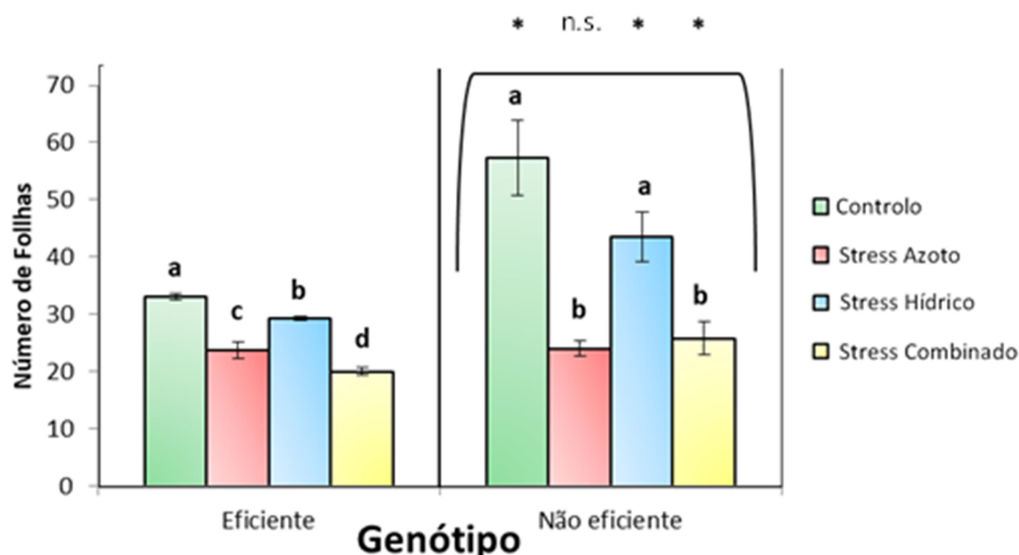


Figura 20. Número de folhas dos tomateiros para os tratamentos com 100% de azoto e 100% capacidade de campo (controlo/verde), 50% de azoto e 100% capacidade de campo (stress azoto/vermelho), 100% de azoto e 50% de capacidade de campo (stress hídrico /azul) 50% de azoto e 50% capacidade de campo (stress combinado/amarelo), para o genótipo eficiente e não eficiente. Os valores representados correspondem à média de seis réplicas e as barras o respetivo erro padrão. Letras diferentes são estatisticamente significativas a $p \leq 0,05$ Estando marcadas com n.s. as barras que não registaram significância entre os mesmos tratamentos, de genótipos diferentes, e com * as que têm diferenças significativas.

Variedades de tomate sensíveis ao stress hídrico podem reduzir entre 50 a 60% da área foliar, enquanto genótipos tolerantes têm menos perdas pois a planta consegue regular o potencial osmótico, não evitando a transpiração e mantendo as atividades metabólicas mesmo em stress (Kamanga, 2020). Além disso, Sousa (2019) demonstra que existe uma relação entre a baixa área foliar e a severidade dos stresses de azoto e combinado. Desta forma, a gravidade do stress hídrico, de azoto e combinado, está dependente da capacidade da planta conseguir manter a área foliar, tratando-se assim este parâmetro de um indicador útil na escolha de um genótipo com uso eficiente dos recursos. O défice de água e azoto limita a área foliar (Ciompi *et al.*, 1996; Okunlola *et al.*, 2015). Quanto à área foliar das plantas testadas (Fig. 21), verificou-se efeito significativo entre tratamentos no genótipo eficiente ($p = 0,000$) e no não eficiente ($p = 0,000$), verificou-se também entre genótipos no tratamento de stress de azoto ($p = 0,000$), contudo, não ocorreu no tratamento controlo ($p = 0,073$),

tratamento de stress hídrico ($p = 0,053$) e tratamento de stress combinado ($p = 0,128$). De qualquer forma é importante referir que o genótipo eficiente teve médias de área foliar superiores para o tratamento controlo (+24,2%), tratamento de stress de azoto (+164,6%), tratamento de stress hídrico (+42,8%), e no stress combinado (+32,4%). Além de se voltar a confirmar o maior impacto e o maior peso no stress combinado por parte do stress de azoto, também se tornam mais uma vez visíveis as diferenças desse tratamento entre genótipos, tendo o genótipo eficiente conseguido manter melhor a sua área foliar comparativamente ao genótipo não eficiente. Mesmo não havendo diferenças significativas entre genótipos é possível ver também o impacto do stress hídrico na área foliar da planta, confirmando assim o sugerido por Jaleel *et al.* (2009) e Kramer (1963).

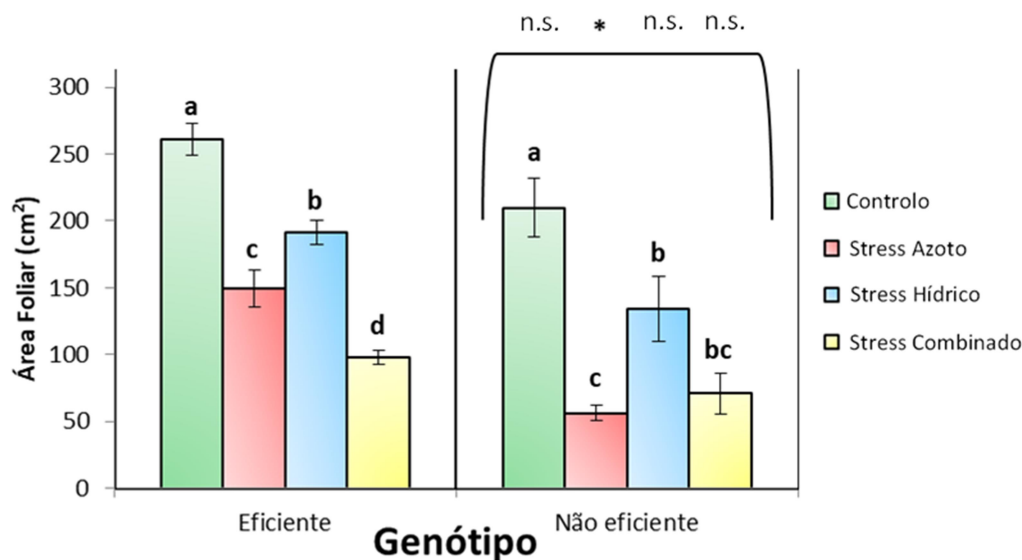


Figura 21. Área foliar dos tomateiros para os tratamentos com 100% de azoto e 100% capacidade de campo (controlo/verde), 50% de azoto e 100% capacidade de campo (stress azoto/vermelho), 100% de azoto e 50% de capacidade de campo (stress hídrico/azul) 50% de azoto e 50% capacidade de campo (stress combinado/amarelo), para o genótipo eficiente e não eficiente. Os valores representados correspondem à média de seis réplicas e as barras o respetivo erro padrão. Letras diferentes são estatisticamente significativas a $p \leq 0,05$. Estando marcadas com n.s. as barras que não registaram significância entre os mesmos tratamentos, de genótipos diferentes, e com * as que têm diferenças significativas.

De entre vários outros parâmetros morfológicos, Selim e El-Nady (2011) estudaram o rácio entre o peso seco das folhas e planta pois este trata-se de um parâmetro de crescimento de elevada importância. Parâmetro esse que dependia do grau de stress hídrico proporcionado ao tomate, obtendo melhores resultados do que o controlo para stresses mais leves, e piores para stresses severos. Como referido anteriormente, os stresses de água e azoto podem resultar numa alocação de assimilados da parte aérea para a raiz, o que contribuiria para uma razão menor, ou podem resultar na manutenção do peso seco foliar, o que costuma ser o caso de

plantas tolerantes que desenvolvem mais a parte aérea, resultando em médias superiores. Em relação à proporção de peso seco entre folhas e planta estudada (Fig. 22), verificou-se efeito significativo entre tratamentos no genótipo eficiente ($p = 0,022$) e no não eficiente ($p = 0,001$), verificou-se também entre genótipos no tratamento de stress de azoto ($p = 0,000$), tratamento stress hídrico ($p = 0,012$) e tratamento stress combinado ($p = 0,004$), contudo, não ocorreu no tratamento controlo ($p = 0,727$). O genótipo eficiente teve médias de proporção de peso seco entre folhas e planta superiores para o tratamento de stress de azoto (+67,6%), tratamento de stress hídrico (+32,5%), e no stress combinado (+43%). Desta forma, é possível observar que, apesar de tanto uma variedade como a outra terem proporções de peso seco entre folhas e planta semelhantes em condições ideais (controlo), isso não ocorre nos tratamentos stress. O genótipo eficiente poderá ter um hábito de crescimento determinado, com poucas perdas na folha face aos stresses sentidos e com médias superiores no parâmetro avaliado. Mais uma vez, isto pode ser justificado pelo facto da planta poder conseguir regular o seu potencial osmótico mantendo as atividades metabólicas mesmo em stress. Desta forma, tem um melhor sistema antioxidante para lidar com stress oxidativo resultante da fotoinibição pelo fecho dos estomas, evitando a danificação dos tecidos, nomeadamente da folha (Kamanga, 2020).

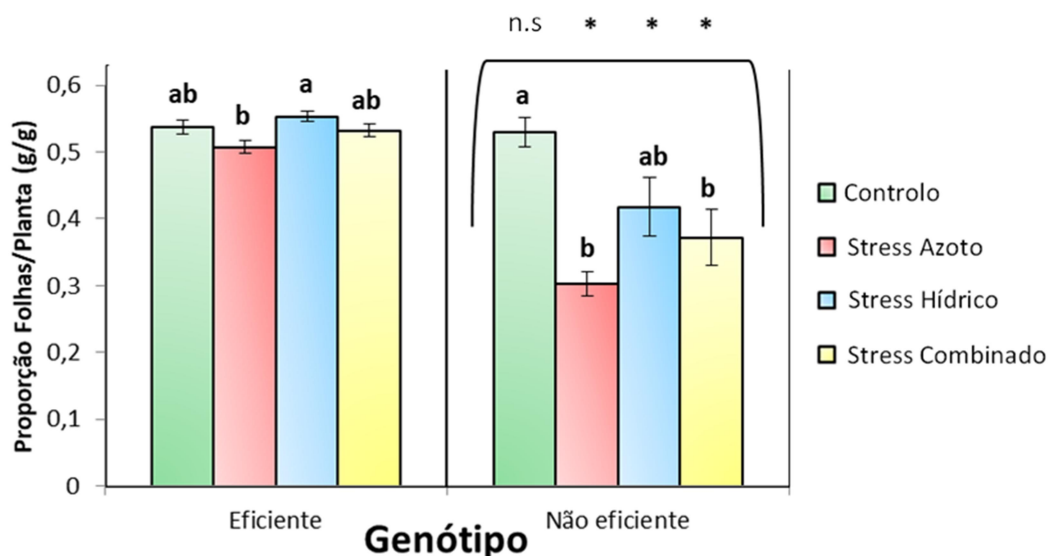


Figura 22. Proporção de peso seco entre folhas e planta dos tomateiros para os tratamentos com 100% de azoto e 100% capacidade de campo (controlo/verde), 50% de azoto e 100% capacidade de campo (stress azoto/vermelho), 100% de azoto e 50% de capacidade de campo (stress hídrico/azul) 50% de azoto e 50% capacidade de campo (stress combinado/amarelo), para o genótipo eficiente e não eficiente. Os valores representados correspondem à média de seis réplicas e as barras o respetivo erro padrão. Letras diferentes são estatisticamente significativas a $p \leq 0,05$. Estando marcadas com n.s. as barras que não registaram significância entre os mesmos tratamentos, de genótipos diferentes, e com * as que têm diferenças significativas.

Por norma, os tomateiros tanto em stress hídrico (Morales *et al.*, 2015; Morando *et al.*, 2014; Razdan, 2006) como de azoto (Eghball & Maranville, 1993) tendem a desenvolver raízes mais profundas, disponibilizando grande parte das reservas do resto da planta (parte aérea) para a raiz. Algo que não costuma acontecer com plantas tolerantes que regulam o potencial osmótico e continuam a desenvolver a parte aérea (Kamanga, 2020). Desta forma, é imperativo ver de que forma o stress influencia a quantidade de biomassa tanto na parte aérea como na raiz, neste caso com recurso à proporção do peso seco entre a parte aérea e raiz, como meio de seleção de variedades tolerantes aos stresses hídrico, de azoto e combinado. Referente à proporção do peso seco entre a parte aérea e raiz plantas (Fig. 23), verificou-se efeito significativo entre tratamentos no genótipo eficiente ($p = 0,009$) e no não eficiente ($p = 0,001$), verificou-se também entre genótipos no tratamento de stress de azoto ($p = 0,001$), contudo, não ocorreu no tratamento controlo ($p = 0,075$) tratamento stress hídrico ($p = 0,984$) e tratamento stress combinado ($p = 0,382$). O genótipo eficiente teve médias de proporção de peso seco entre a parte aérea e raiz superiores para o tratamento de stress de azoto (+61,5%) inferiores no tratamento controlo (-17,3%), e semelhantes no tratamento de stress hídrico e stress combinado. Como referido por Kramer (1963) o stress de azoto costuma induzir um maior desenvolvimento da raiz afetando negativamente a parte aérea, ou seja, uma redução na proporção parte aérea/raiz. Neste estudo, o genótipo eficiente conseguiu desenvolver os seus diferentes órgãos numa proporção semelhante à do controlo em todos os stresses menos no combinado. Isto demonstra um comportamento tolerante por parte do genótipo eficiente a stresses de água e azoto e que o stress combinado realmente culminou em efeitos mais severos obrigando mesmo este genótipo a certos comportamentos adaptativos.

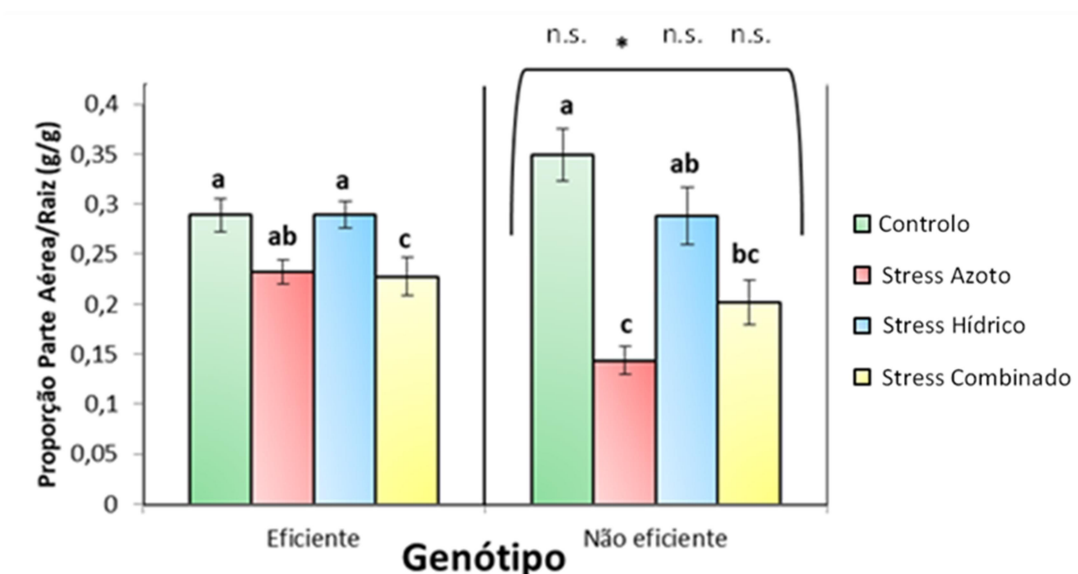


Figura 23. Proporção de peso seco entre parte aérea e raiz dos tomateiros para os tratamentos com 100% de azoto e 100% capacidade de campo (controlo/verde), 50% de azoto e 100% capacidade de campo (stress azoto/vermelho), 100% de azoto e 50% de capacidade de campo (stress hídrico/azul) 50% de azoto e 50% capacidade de campo (stress combinado/amarelo), para o genótipo eficiente e não eficiente. Os valores representados correspondem à média de seis réplicas e as barras o respetivo erro padrão. Letras diferentes são estatisticamente significativas a $p \leq 0,05$. Estando marcadas com n.s. as barras que não registaram significância entre os mesmos tratamentos, de genótipos diferentes, e com * as que têm diferenças significativas.

Como referido anteriormente, a redução da área foliar específica é possivelmente uma estratégia para lidar com o stress hídrico, em que as folhas apresentam uma maior capacidade fotossintética e, portanto, uma maior produção de biomassa (Machado *et al.*, 2021). Em relação à área foliar específica das plantas avaliadas (Fig. 24), não se verificou efeito significativo entre tratamentos no genótipo eficiente ($p = 0,057$) e no não eficiente ($p = 0,200$), além disso não se verificou entre genótipos no tratamento controlo ($p=0,491$), tratamento de stress de azoto ($p = 0,378$), tratamento de stress hídrico ($p = 0,642$) e tratamento de stress combinado ($p = 0,681$). A área foliar específica corresponde à razão entre a área foliar e o peso seco das folhas. Sabe-se que aquando do stress hídrico é aumentada a cutinização a lenhificação e a espessura da folha (Kramer, 1963), que poderá contribuir para um peso superior da folha, e diminuir a área foliar (Kramer, 1963). Neste estudo, a área foliar específica não parece ter sido a razão pelo qual o genótipo eficiente conseguiu lidar melhor com os stresses impostos. Isto pode-se dever ao facto deste parâmetro estar mais ligado a uma adaptação ao stress hídrico, sendo que este stress nesta experiência parece ter sido menos severo quer por pouca intensidade ou pouca duração do stress.

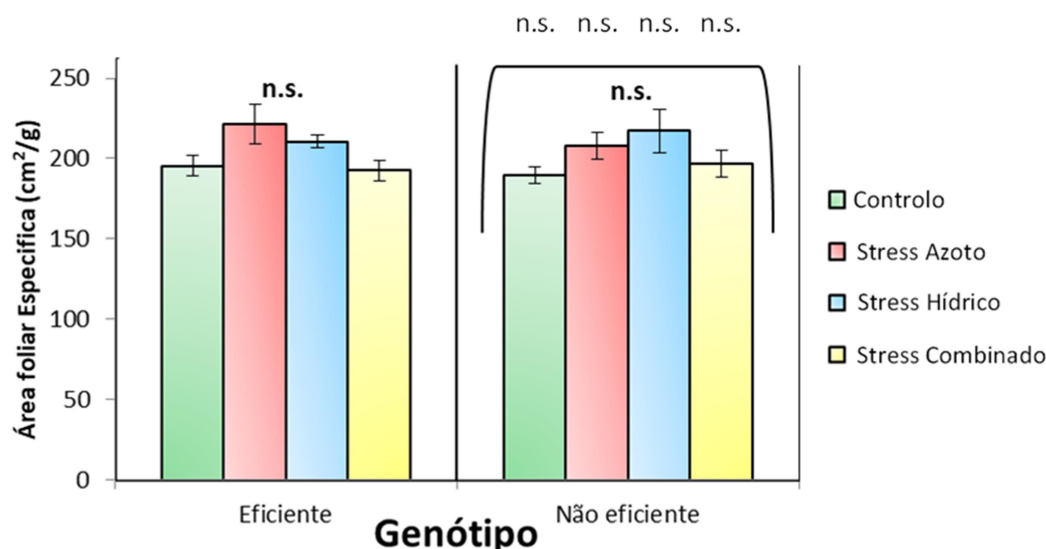


Figura 24. Área foliar específica dos tomateiros para os tratamentos com 100% de azoto e 100% capacidade de campo (controlo/verde), 50% de azoto e 100% capacidade de campo (stress azoto/vermelho), 100% de azoto e 50% de capacidade de campo (stress hídrico/azul) 50% de azoto e 50% capacidade de campo (stress combinado/amarelo), para o genótipo eficiente e não eficiente. Os valores representados correspondem à média de seis réplicas e as barras o respetivo erro padrão. Letras diferentes são estatisticamente significativas a $p \leq 0,05$. Estando marcadas com n.s. as barras que não registaram significância entre os mesmos tratamentos, de genótipos diferentes, e com * as que têm diferenças significativas.

Como havia sido referido uma área foliar ideal é de extrema importância para a planta, principalmente pela sua influência na fotossíntese (Machado *et al.*, 2021). Também é imperativo saber se a planta consegue manter a sua área foliar em relação ao seu peso total sob stress, pois vai-se traduzir num indicador geral da capacidade da planta em continuar a produzir fotoassimilados nestas condições. Quanto à proporção de área foliar pelo peso seco das plantas calculada (Fig. 25), não se verificou efeito significativo entre tratamentos no genótipo eficiente ($p = 0,131$), mas sim no não eficiente ($p = 0,008$). Além disso não se verificou entre genótipos no tratamento controlo ($p=0,192$), tratamento de stress hídrico ($p = 0,067$), ao contrário do tratamento de stress de azoto ($p = 0,000$) e tratamento de stress combinado ($p = 0,007$). Apesar disso é importante referir que o genótipo eficiente teve médias de proporção de área foliar superiores para o tratamento de stress de azoto (+78%), no tratamento de stress hídrico (+28%), e no stress combinado (+40,6%). O facto de não existirem diferenças significativas entre tratamentos para o genótipo eficiente reforça a hipótese de que este genótipo conseguiu manter o seu crescimento normal mesmo durante a imposição de stress hídrico, azoto e combinado. Além disso, verificou-se também que o tratamento com piores resultados no genótipo não eficiente foi o de stress de azoto, e que o de stress hídrico pouca diferença teve para o tratamento controlo, mais uma vez realçando o efeito mais severo do stress de azoto comparativamente ao hídrico.

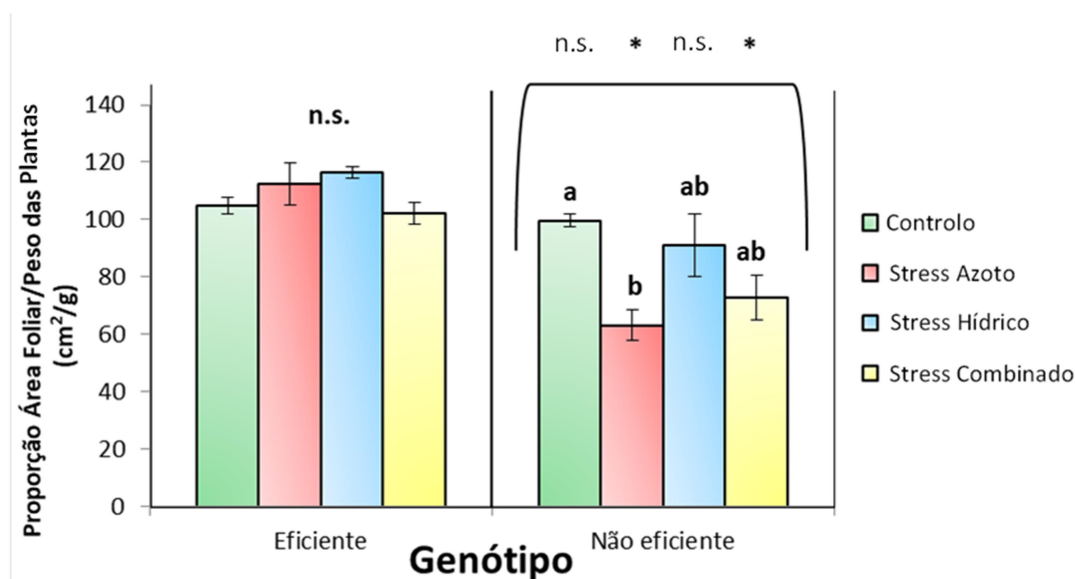


Figura 25. Proporção de área foliar pelo peso seco dos tomateiros para os tratamentos com 100% de azoto e 100% capacidade de campo (controlo/verde), 50% de azoto e 100% capacidade de campo (stress azoto/vermelho), 100% de azoto e 50% de capacidade de campo (stress hídrico/azul) 50% de azoto e 50% capacidade de campo (stress combinado/amarelo), para o genótipo eficiente e não eficiente. Os valores representados correspondem à média de seis réplicas e as barras o respetivo erro padrão. Letras diferentes são estatisticamente significativas a $p \leq 0,05$. Estando marcadas com n.s. as barras que não registaram significância entre os mesmos tratamentos, de genótipos diferentes, e com * as que têm diferenças significativas.

4.2.3. Parâmetros fisiológicos

Além dos parâmetros morfológicos referentes a medições biométricas diretas e indiretas, para avaliação da eficiência de absorção e uso de água e azoto, de modo a aferir os mecanismos responsáveis pelo comportamento adaptativo das variedades face a stress hídrico, de azoto e combinado de água e azoto, foram ainda estudados diversos parâmetros fisiológicos de entre eles o teor de clorofila (índice SPAD), a eficiência do uso de água e o consumo de água por área foliar.

4.2.3.1 SPAD

Machado *et al.* (2021) sugeriu que um maior teor de clorofila está ligado com uma maior capacidade fotossintética e, portanto, uma maior produção de biomassa. Uma disponibilidade adequada de azoto e de água irá proporcionar teores superiores de clorofila (Basal & Szabó, 2020), resultando em maiores taxas fotossintéticas culminando num melhor desenvolvimento da planta (Arora *et al.* (2001); Roy *et al.* (2006)). No teor de clorofila das plantas medidas (Fig. 26), verificou-se efeito significativo entre tratamentos no genótipo eficiente ($p = 0,006$) e no não eficiente ($p = 0,000$), verificou-se também entre genótipos no tratamento controlo ($p = 0,012$), no tratamento stress de azoto ($p = 0,001$) tratamento stress hídrico ($p = 0,011$) e tratamento stress combinado ($p = 0,001$). O genótipo eficiente teve médias de teor de

clorofila superiores para o tratamento controlo (+20,7%), no tratamento stress de azoto (+54,7%), no tratamento de stress hídrico (+26,1%), e no tratamento de stress combinado (+37,8%). Como é esperado, o tratamento que piores médias de teor de clorofila obteve foi o de stress de azoto, sendo mais uma vez este o mais influente no stress combinado. É imperativo referir que o teor de clorofila do genótipo eficiente é naturalmente superior, o que se refletiu em todos os tratamentos. Segundo Roy *et al.* (2006) e Abenavoli *et al.* (2016) o azoto é um constituinte da clorofila, as variedades que naturalmente conseguem ter maiores concentrações de azoto disponível também irão registar um maior teor de clorofila. Por outro lado, de acordo com Jaleel *et al.* (2009), seria de esperar um menor teor também no tratamento de stress hídrico em comparação com tratamento controlo, algo que não se verificou em nenhum dos genótipos, sugerindo mais uma vez que o stress hídrico imposto não teve a duração suficiente ou foi de pouca intensidade.

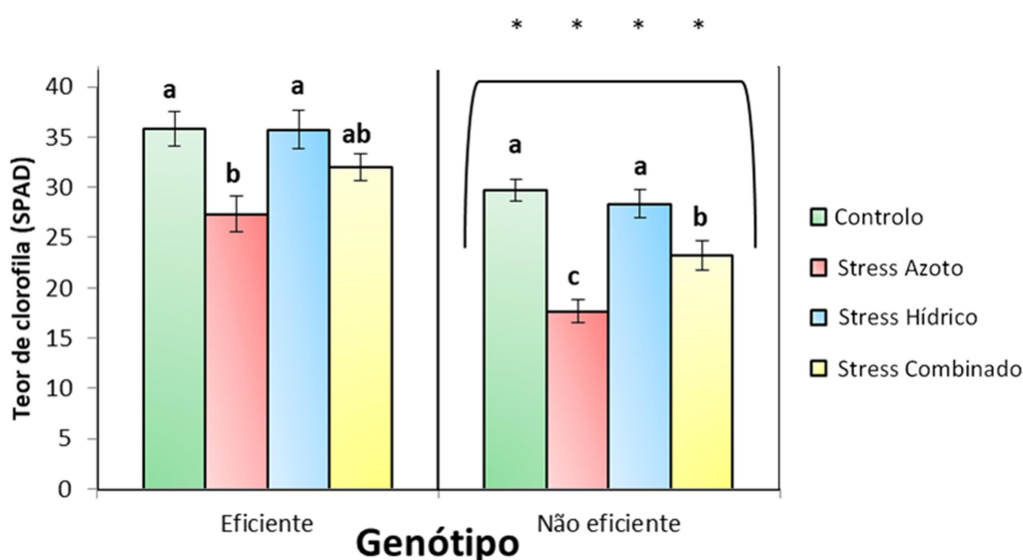


Figura 26. Teor de clorofila (SPAD) dos tomateiros para os tratamentos com 100% de azoto e 100% capacidade de campo (controlo/verde), 50% de azoto e 100% capacidade de campo (stress azoto/vermelho), 100% de azoto e 50% de capacidade de campo (stress hídrico/azul) 50% de azoto e 50% capacidade de campo (stress combinado/amarelo), para o genótipo eficiente e não eficiente. Os valores representados correspondem à média de seis réplicas e as barras o respetivo erro padrão. Letras diferentes são estatisticamente significativas a $p \leq 0,05$. Estando marcadas com n.s. as barras que não registaram significância entre os mesmos tratamentos, de genótipos diferentes, e com * as que têm diferenças significativas.

4.2.3.2 Eficiência do Uso de água

Sendo o objetivo primordial de toda a investigação um menor uso de recursos, nomeadamente água, de maneira a manter ou melhorar a produtividade de culturas economicamente importantes como o tomate, um indicador direto que é imprescindível estudar é o de eficiência de uso de água. Além disso, dentro deste parâmetro existe ainda o de consumo de água em função da área foliar, visto que a área foliar ideal é

um ponto a favor para uma fotossíntese eficiente e para todo o crescimento/funcionamento da planta. Humbert et al. (2013) e Song *et al.* (2019) sugeriram que a disponibilidade de água e azoto afetam de forma multiplicativa a eficiência no uso de água em algumas culturas. Selim e El-Nady (2011) refere que com stresses hídricos mais severos o tomate aumenta a sua eficiência no uso da água. Com os resultados obtidos (Fig. 27), verificou-se um efeito significativo entre tratamentos no genótipo eficiente ($p = 0,000$) e no não eficiente ($p = 0,000$). Contudo, não se verificou entre genótipos no tratamento controlo ($p = 0,374$), tratamento de stress hídrico ($p = 0,645$) e tratamento de stress combinado ($p = 0,125$), mas sim no tratamento de stress de azoto ($p = 0,000$). Mesmo assim, o genótipo eficiente teve médias de eficiência no uso de água superiores para o tratamento de stress de azoto (+42,7%) e tratamento stress combinado (+21,1%). A partir do défice hídrico severo a transpiração por parte da planta é mínima, tal como a condutividade hidráulica da raiz (Pimentel, 2004; Sinclair & Ludlow, 1986), desta forma, além das perdas de água serem mínimas também o são os consumos, algo que se confirma nos dados abaixo. É de notar a média superior de eficiência em especial no genótipo eficiente no tratamento de stress de azoto. Este genótipo apresenta um comportamento de tolerância ao stress combinado que se deve à sua capacidade de lidar com o stress de azoto.

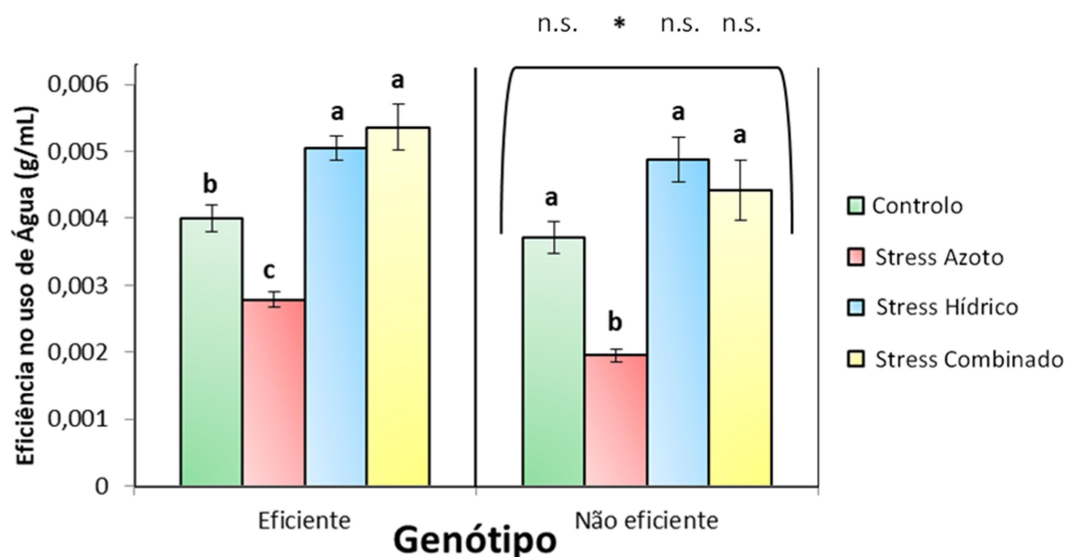


Figura 27. Eficiência no uso de água dos tomateiros para os tratamentos com 100% de azoto e 100% capacidade de campo (controlo/verde), 50% de azoto e 100% capacidade de campo (stress azoto/vermelho), 100% de azoto e 50% de capacidade de campo (stress hídrico/azul) 50% de azoto e 50% capacidade de campo (stress combinado/amarelo), para o genótipo eficiente e não eficiente. Os valores representados correspondem à média de seis réplicas e as barras o respetivo erro padrão. Letras diferentes são estatisticamente significativas a $p \leq 0,05$. Estando marcadas com n.s. as barras que não registaram significância entre os mesmos tratamentos, de genótipos diferentes, e com * as que têm diferenças significativas. A análise estatística dos dois genótipos foi feita de forma independente.

Referentemente à razão entre o consumo de água pela área foliar das plantas (Fig. 28), verificou-se efeito significativo entre tratamentos no genótipo eficiente ($p = 0,000$) e no não eficiente ($p = 0,000$). Contudo, não se verificou entre genótipos no tratamento controlo ($p=0,090$), tratamento de stress hídrico ($p = 0,220$), mas sim no tratamento de stress de azoto ($p = 0,001$) e no tratamento de stress combinado ($p = 0,037$). Mesmo assim, genótipo eficiente teve médias de consumo de água pela área foliar das plantas inferiores para o tratamento controlo (-12,5%), tratamento de stress de azoto (-61,7%), tratamento de stress hídrico (-37,9%), e no tratamento stress combinado (-48,2%). O consumo de água por área foliar é inferior no genótipo eficiente como ocorreu com o genótipo eficiente de Atherton e Rudich (2012) “esta cultivar tem melhor uso de água e menos desperdícios, apesar de uma área foliar superior”.

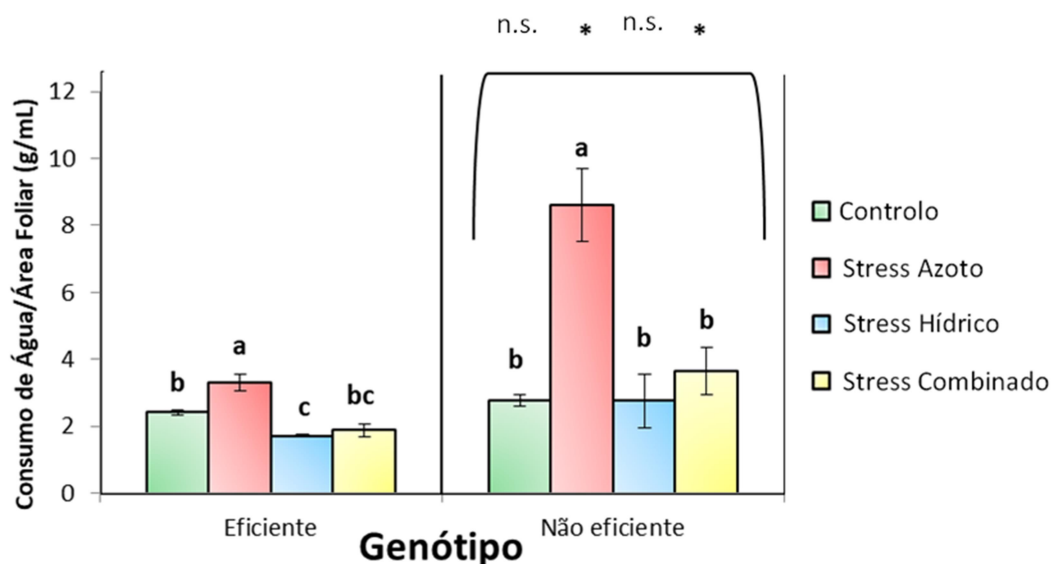


Figura 28. Razão entre consumo de água e área foliar dos tomateiros para os tratamentos com 100% de azoto e 100% capacidade de campo (controlo/verde), 50% de azoto e 100% capacidade de campo (stress azoto/vermelho), 100% de azoto e 50% de capacidade de campo (stress hídrico/azul) 50% de azoto e 50% capacidade de campo (stress combinado/amarelo), para o genótipo eficiente e não eficiente. Os valores representados correspondem à média de seis réplicas e as barras o respetivo erro padrão. Letras diferentes são estatisticamente significativas a $p \leq 0,05$. Estando marcadas com n.s. as barras que não registaram significância entre os mesmos tratamentos, de genótipos diferentes, e com * as que têm diferenças significativas.

5. Conclusão e Perspetivas Futuras

Na primeira parte deste estudo pretendeu-se avaliar o desempenho do bioestimulante comercial BlueN®, por forma a aferir o seu potencial como estratégia sustentável na redução do uso de azoto e água em plantas de tomate cv. “Micro-Tom” (*Solanumlycopersicum L.*) submetidas a stress combinado de água e azoto. Os resultados obtidos permitiram concluir que este bioestimulante conduz a um aumento significativo do peso seco da raiz aquando do stress combinado (27,6%), pelo que o BlueN® melhora a performance da raiz, ajudando-a a desenvolver uma melhor estrutura e a combater os efeitos negativos provocados pela carência de água e de azoto. Contudo, ao nível dos restantes parâmetros morfofisiológicos avaliados, os efeitos encontrados não foram significativos. Deste modo, como trabalho futuro seria importante: (i) avaliar o efeito do bioestimulante aplicado na cultura de tomate com uma maior frequência ou numa concentração superior; (ii) complementar este tipo de avaliações morfofisiológicas com avaliações bioquímicas e genéticas para melhor compreender o impacto do BlueN® em tomate sob estes stresses (stress oxidativo, transportadores de azoto, etc).

No que respeita a segunda parte do estudo, onde foram avaliados dois genótipos contrastantes com o objetivo de comparar a sua resposta morfofisiológica aquando da sua exposição a stress hídrico, de azoto e combinado de água e azoto, foi possível observar, que o stress de azoto parece ter um maior impacto que o stress hídrico na planta, sendo o fator com mais influência no stress combinado. Esta conclusão baseia-se em: médias inferiores obtidas ao nível do peso seco do caule, número de folhas e teor de clorofila no genótipo não eficiente e peso seco das folhas e área foliar no genótipo eficiente, para os tratamentos de stress de azoto e stress combinado; médias semelhantes entre os tratamentos de stress de azoto e stress combinado, sendo distintas do stress hídrico para os parâmetros descritos. Além disso, o genótipo eficiente apresentou um comportamento tolerante aos stresses impostos, causado pela sua capacidade de manter melhor os seus atributos morfológicos aquando do stress de azoto (peso seco, área foliar, proporção folhas/planta, proporção parte aérea/raiz) e também por apresentar geralmente um maior teor de clorofilas em particular no stress de azoto comparativamente ao genótipo não eficiente. Este ensaio serviu como complemento ao estudo do stress combinado de água e azoto, ao contrário dos stresses individuais, este trata-se de uma matéria ainda pouco explorada. No futuro seria pertinente fazer uma avaliação mais profunda, englobando aspetos do sistema de defesa antioxidante das plantas para averiguar o

dano verificado após os stresses, assim como a resposta antioxidante a esse dano e também outros parâmetros como a expressão de genes relacionados com os stresses impostos (transportadores de azoto, sistema antioxidante, aquaporinas, autofagia, etc).

6. Referências

- Abenavoli, M. R., Longo, C., Lupini, A., et al. (2016). Phenotyping two tomato genotypes with different nitrogen use efficiency. *Plant Physiology*, 107, 21-32.
- Almeida, A. Q., & Soratto, R. P. (2014). Teor e acúmulo de nutrientes no feijoeiro em função da aplicação de bioestimulante. *Semina. Ciências Agrárias*, 2259-2272.
- Amaral, A., & Oliveira, J. (2020). Influência da aplicação de diferentes doses de azoto em cevada dística para malte. *Revista UI_IPSantarém*, 8(3), 5-19.
- Arora, A., Singh, V., & Mohan, J. (2001). Effect of nitrogen and water stress on photosynthesis and nitrogen content in wheat. *Biologia Plantarum*, 44(1), 153-155.
- Arrobas, M., & Rodrigues, M. (2009). Efeito da adubação azotada, fosfatada e potássica na cultura da batata.: Produtividade e eficiência de uso dos nutrientes. *Revista de Ciências Agrárias*, 32(1), 101-111.
- Atherton, J., & Rudich, J. (2012). *The tomato crop: a scientific basis for improvement*: Springer Science & Business Media.
- Baez, A., Morales, Y. E., Quintero, V., et al. (2017). Next generation of microbial inoculants for agriculture and bioremediation. 10(1), 19-21.
- Basal, O., & Szabó, A. (2020). The combined effect of drought stress and nitrogen fertilization on soybean. *Agronomy Journal*, 10(3), 384.
- Bashan, Y., Hernández, J. P., Puente, M. E., et al. (1996). Inoculantes microbianos sintéticos: son el futuro para la agricultura?
- Belhassen, E. (1997). *Drought tolerance in higher plants: genetical, physiological and molecular biological analysis*: Springer.
- Bharadwaj, D. N. (2016). Sustainable agriculture and plant breeding. In *Advances in plant breeding strategies: agronomic, abiotic and biotic stress traits* (pp. 3-34): Springer.
- Braga, M. B., & Lima, C. E. P. (2014). *Reuso de água na agricultura*: Embrapa Brasília.
- Brown, P., & Saa, S. (2015). Biostimulants in agriculture. *Frontiers in plant science*, 6, 671.
- Carvalho, M. F., Lanna, A., & Stein, V. (2012). *Arroz C4: desafios e perspectivas*. Embrapa Arroz e Feijão-Documentos.
- Chun, L., Mi, G., Li, J., et al. (2005). Genetic analysis of maize root characteristics in response to low nitrogen stress. *Plant Soil*, 276(1), 369-382.
- CiOMPI, S., Gentili, E., Guidi, L., et al. (1996). The effect of nitrogen deficiency on leaf gas exchange and chlorophyll fluorescence parameters in sunflower. 118(2), 177-184.
- Corti, M., Gallina, P. M., Cavalli, D., et al. (2017). Hyperspectral imaging of spinach canopy under combined water and nitrogen stress to estimate biomass, water, and nitrogen content. 158, 38-50.
- Crist, E., Mora, C., & Engelman, R. (2017). The interaction of human population, food production, and biodiversity protection. *Science*, 356(6335), 260-264.
- Dias, J. S. (1997). *Código de boas práticas agrícolas*. Laboratório Químico-Agrícola Rebelo da Silva, Lisboa, 55.
- Díez, M. J., & Nuez, F. (2008). Tomato. In *Vegetables II* (pp. 249-323): Springer.
- Du, T., Kang, S., Zhang, J., et al. (2015). Deficit irrigation and sustainable water-resource strategies in agriculture for China's food security. *Journal of experimental Botany*, 66(8), 2253-2269.
- Du, Y.-D., Niu, W.-Q., Gu, X.-B., et al. (2018). Water-and nitrogen-saving potentials in tomato production: A meta-analysis. 210, 296-303.
- Eghball, B., & Maranville, J. W. (1993). Root development and nitrogen influx of corn genotypes grown under combined drought and nitrogen stresses. *Agronomy Journal*, 85(1), 147-152.

- Elbehri, A. (2015). Climate change and food systems: global assessments and implications for food security and trade: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- Ellis, B., & Foth, H. (1996). Soil fertility: CRC Press.
- Fagioli, M., Barreto, M., Andrade, E., et al. (2012). Influence of biostimulants on the physiological quality of pepper and cucumber seeds. Paper presented at the VI International Symposium on Seed, Transplant and Stand Establishment of Horticultural Crops 1249.
- FAO. (2019). Data Crops.
- FAOSTAT, F. (2021). FAOSTAT data.
- Fernandes, A. P. G., Machado, J., Fernandes, T. R., et al. (2021). Water and nitrogen fertilization management in light of climate change: impacts on food security and product quality. In: Kumar, V., Srivastava, A.K., Suprasanna, P. (Eds.), Plant Nutrition and Food Security in the Era of Climate Change. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822916-3.00013-5>
- Figueira, M. A., C; Neves, C. (2007). Nitratos. Retrieved from <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/riscos-quimicos/nitratos.aspx>
- Foth, H. D. (1978). Fundamentals of soil science. Soil Science, 125(4), 272.
- Garnett, T., Conn, V., & Kaiser, B. N. (2009). Root based approaches to improving nitrogen use efficiency in plants. Plant, cell environment, 32(9), 1272-1283.
- Gerszberg, A., Hnatuszko, K., Kowalczyk, T., et al. (2015). Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology. 120(3), 881-902.
- Gholinezhad, E., Aynaband, A., Ghorthapeh, A. H., et al. (2009). Study of the effect of drought stress on yield, yield components and harvest index of sunflower hybrid Iroflor at different levels of nitrogen and plant population. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 37(2), 85-94.
- Gil, P. T. d., Fontes, P. C. R., Cecon, P. R., et al. (2002). Índice SPAD para o diagnóstico do estado de nitrogênio e para o prognóstico da produtividade da batata. Horticultura Brasileira, 20, 611-615.
- Godfray, H. C. J., Beddington, J. R., Crute, I. R., et al. (2010). Food security: the challenge of feeding 9 billion people. 327(5967), 812-818.
- Gomes, L. P. (2019). Bioestimulantes e seus efeitos nos componentes da produção, nas trocas gasosas e na eficiência de uso da água no tomateiro sob restrição hídrica. .
- Gould, W. A. (2013). Tomato production, processing and technology: Elsevier.
- Greenwood, E. (1976). Nitrogen stress in plants. In Advances in Agronomy (Vol. 28, pp. 1-35): Elsevier.
- Guilpart, N., Metay, A., & Gary, C. (2014). Grapevine bud fertility and number of berries per bunch are determined by water and nitrogen stress around flowering in the previous year. European Journal of Agronomy, 54, 9-20.
- Howden, S. M., Soussana, J. F., Tubiello, F. N., et al. (2007). Adapting agriculture to climate change. Proceedings of the national academy of sciences, 104(50), 19691-19696.
- Hsiao, T. C., & Xu, L. K. (2000). Sensitivity of growth of roots versus leaves to water stress: biophysical analysis and relation to water transport. Journal of experimental Botany, 51(350), 1595-1616.
- Humbert, S., Subedi, S., Cohn, J., et al. (2013). Genome-wide expression profiling of maize in response to individual and combined water and nitrogen stresses. 14(1), 1-13.
- Igual, J. M., Valverde, Á., Cervantes, E., et al. (2001). Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study.
- INE. (2018). Estatísticas Agrícolas 2017. Instituto Nacional de Estatística, I.P.

- Jaleel, C. A., Manivannan, P., Wahid, A., et al. (2009). Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *International Journal of Agriculture & Biology*, 11(1), 100-105.
- Joel, G., Gamon, J. A., & Field, C. B. (1997). Production efficiency in sunflower: the role of water and nitrogen stress. *Remote sensing of environment*, 62(2), 176-188.
- Jones, J. B. (2007). *Tomato plant culture: in the field, greenhouse, and home garden*: CRC press.
- Kamanga, R. M. (2020). Screening and differential physiological responses of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) to drought stress. *Plant Physiology Reports*, 25(3), 472-482.
- Kant, S., Bi, Y.-M., & Rothstein, S. J. (2011). Understanding plant response to nitrogen limitation for the improvement of crop nitrogen use efficiency. *Journal of experimental Botany*, 62(4), 1499-1509.
- Kaunda, J. S., & Zhang, Y.-J. (2019). The genus *solanum*: an ethnopharmacological, phytochemical and biological properties review. *Natural products bioprospecting*, 9(2), 77-137.
- Khan, S. H., Arsalan, K., Uzma, L., et al. (2015). Effect of drought stress on tomato cv. Bombino. *Journal of Food Processing* 6(7).
- Kimura, S., & Sinha, N. (2008). Tomato (*Solanum lycopersicum*): a model fruit-bearing crop. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2008(11), pdb. emo105.
- Kramer, P. J. (1963). Water Stress and Plant Growth 1. *Agronomy Journal*, 55(1), 31-35.
- Kusano, M., Fukushima, A., Redestig, H., et al. (2011). Metabolomic approaches toward understanding nitrogen metabolism in plants. 62(4), 1439-1453.
- Kuykendall, L. D., Young, J. M., Martínez-Romero, E., et al. (2015). *Rhizobium*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea Bacteria*, 1-36.
- Law, C., Husni, A. Z. M., Akmar, A. S. N., et al. (2014). Leaf nitrogen content in oil palm seedlings and their relationship to SPAD chlorophyll meter readings. *Journal of Oil Palm, Environment*, 5.
- Liang, L., Ridoutt, B. G., Lal, R., et al. (2019). Nitrogen footprint and nitrogen use efficiency of greenhouse tomato production in North China. *Journal of Cleaner Production*, 208, 285-296.
- Liu, X., Yin, C., Xiang, L., et al. (2020). Transcription strategies related to photosynthesis and nitrogen metabolism of wheat in response to nitrogen deficiency. 20(1), 1-13.
- Machado, J., Fernandes, A. P. G., Fernandes, T. R., et al. (2021). Drought and nitrogen stress effects and tolerance mechanisms in tomato: a review. In: Kumar, V., Srivastava, A.K., Suprasanna, P. (Eds.), *Plant Nutrition and Food Security in the Era of Climate Change*. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822916-3.00014-7>
- McCauley, A., Jones, C., & Jacobsen, J. (2009). Plant nutrient functions and deficiency and toxicity symptoms. *Nutrient management module*, 9, 1-16.
- Moles, T. M., Mariotti, L., De Pedro, L. F., et al. (2018). Drought induced changes of leaf-to-root relationships in two tomato genotypes. *Plant Physiology Biochemistry*, 128, 24-31.
- Morales, R. G. F., Resende, L. V., Bordini, I. C., et al. (2015). Caracterização do tomateiro submetido ao déficit hídrico. 16(1), 9-17.
- Morando, R., da Silva, A. O., Carvalho, L. C., et al. (2014). Déficit hídrico: Efeito sobre a cultura da soja.
- Nahar, K., & Gretzmacher, R. (2011). Response of shoot and root development of seven tomato cultivars in hydroponic system under water stress. *Acad. J. Plant Sci*, 4(2), 57-63.
- Naika, S., Jeude, J., Goffau, M., et al. (2006). *A Cultura do tomate*. 104, 104.
- Nonami, H. (1998). Plant water relations and control of cell elongation at low water potentials. *Journal of Plant Research*, 111(3), 373-382.

- Okunlola, G. O., Olatunji, O. A., Afolabi, A. M., et al. (2015). Effects of nitrogen nutritional stress on the morphological and yield parameters of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Sciences in Cold and Arid Regions*(2015 02), 137-145.
- Pasini, M. P. B., Gazolla, D. M., Bulegon, L. F., et al. (2020). Programa de manejo biológico e seu impacto sobre a produtividade da soja. *Cadernos de Agroecologia*, 15(2).
- Pervez, M., Ayub, C., Khan, H., et al. (2009). Effect of drought stress on growth, yield and seed quality of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 46, 174-178.
- Pimentel, C. (2004). A relação da planta com a água. Seropédica: Edur.
- Pokluda, R., Petříková, K., Abdelaziz, M. E., et al. (2010). Effect of water stress on selected physiological characteristics of tomatoes. *Acta Univ Agric et Silv Mendel Brun*, 58(1), 131-138.
- Razdan, M. K. (2006). Genetic improvement of solanaceous crops volume 2: tomato: CRC Press.
- Regato, M. A., Almeida, V., Sousa, R. M., et al. (2004). Influência da aplicação de três doses de azoto na produtividade do pessegueiro.
- Rigano, M., Arena, C., Di Matteo, A., et al. (2016). Eco-physiological response to water stress of drought-tolerant and drought-sensitive tomato genotypes. 150(4), 682-691.
- Rodrigues, M. (2000). Gestão do azoto na cultura da batata: estabelecimento de indicadores do estado nutritivo das plantas e da disponibilidade de azoto no solo. 1-348.
- Rodrigues, M., & Coutinho, J. (2000). Eficiência de utilização do azoto pelas plantas. In (Vol. 47): Instituto Politécnico de Bragança.
- Rodrigues, P. H. M., Ruzante, J. M., Senatore, A. L., et al. (2004). Avaliação do uso de inoculantes microbianos sobre a qualidade fermentativa e nutricional da silagem de milho. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 33, 538-545.
- Roy, R. N., Finck, A., Blair, G., et al. (2006). Plant nutrition for food security. A guide for integrated nutrient management. *FAO Fertilizer Plant Nutrition Bulletin*, 16, 368.
- Ruiz, J. M., Romero, L., & Chemistry, F. (1998). Tomato genotype in relation to nitrogen utilization and yield. *Journal of Agricultural*, 46(10), 4420-4422.
- Santos, J. Q. (1996). Fertilização. Fundamentos da utilização dos adubos e correctivos. (30).
- Santos, M. S., Nogueira, M. A., & Hungria, M. (2019). Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. *AMB Express*, 9(1), 1-22.
- Selim, A.-F. H., & El-Nady, M. F. (2011). Physio-anatomical responses of drought stressed tomato plants to magnetic field. *Acta Astronautica*, 69(7-8), 387-396.
- Sharp, R. (2002). Interaction with ethylene: changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress. *Plant, cell environment*, 25(2), 211-222.
- Sinclair, T., & Ludlow, M. (1986). Influence of soil water supply on the plant water balance of four tropical grain legumes. *Functional Plant Biology*, 13(3), 329-341.
- Singh, B., & Schulze, D. (2015). Soil minerals and plant nutrition. *Nature Education Knowledge*, 6(1), 1.
- Skinner, R. H., & Comas, L. H. (2010). Root distribution of temperate forage species subjected to water and nitrogen stress. *Crop science*, 50(5), 2178-2185.
- Song, J., Wang, Y., Pan, Y., et al. (2019). The influence of nitrogen availability on anatomical and physiological responses of *Populus alba* × *P. glandulosa* to drought stress. *BMC plant biology*, 19(1), 1-12.
- Sousa, D. G. C. (2019). Efeitos de stress combinado de água e azoto em tomate (cv.'Micro-Tom').
- Symborg (2020). [Apresentação BlueN].
- Thomas, A. L. (2018). Soja: tipos de crescimento da planta.

- Tilman, D., Balzer, C., Hill, J., et al. (2011). Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. 108(50), 20260-20264.
- Weese, T. L., & Bohs, L. (2007). A three-gene phylogeny of the genus *Solanum* (Solanaceae). *Systematic Botany Monographs*, 32(2), 445-463.
- Wiedenhoeft, A. C. (2006). *Plant nutrition*: Infobase Publishing.
- Zandonadi, D. (2018). Bioestimulantes e produção de hortaliças. Embrapa Hortaliças, Artigo de divulgação na mídia.
- Zhang, X. (2017). A plan for efficient use of nitrogen fertilizers. *Nature*, 543(7645), 322-323.
- Zhao, D., Reddy, K. R., Kakani, V. G., et al. (2005). Nitrogen deficiency effects on plant growth, leaf photosynthesis, and hyperspectral reflectance properties of sorghum. *European Journal of Agronomy*, 22(4), 391-403.