UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

Influência do zinco e do selénio no comportamento fisiológico do trigo

- Versão Definitiva -

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM ENGENHARIA AGRONÓMICA

Gonçalo Nuno de São Pedro Engrácia Ferrari de Almeida

Orientador: José Manuel Moutinho Pereira

Coorientador: Carlos Manuel Correia

Vila Real, 2019

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

Influência do zinco e do selénio no comportamento fisiológico do trigo

- Versão Definitiva -

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM ENGENHARIA AGRONÓMICA

Gonçalo Nuno de São Pedro Engrácia Ferrari de Almeida

Orientador: José Manuel Moutinho Pereira

Coorientador: Carlos Manuel Correia

Composição do Júri:

_____

_____

_____

Vila Real, 2019

Os Orientadores:

_____

José Manuel Moutinho-Pereira
Departamento de Biologia e Ambiente, UTAD

_____

Carlos Manuel Correia
Departamento de Biologia e Ambiente, UTAD

“*Querer ser bem-sucedido sem trabalhar duro*
é como querer colher sem plantar”
- David Bly -

AGRADECIMENTOS

Manifesto os meus maiores agradecimentos a todos os que, de uma forma ou outra, contribuíram e participaram na realização desta dissertação.

- Aos professores José Manuel Moutinho Pereira e Carlos Manuel Correia pela amizade e oportunidade, sem hesitações, para eu integrar esta linha de trabalho de investigação.

- Ao Luís Rocha, Ivo Pavia e restante equipa, incluindo a querida Lena e o Sr. Alcídeo, por todos os ensinamentos e por todo tempo que me disponibilizaram. Certamente não seria possível sem a vossa ajuda.

- A todos os meus docentes e colegas de mestrado.

- Ao Lind Enoque por toda a ajuda e pela disponibilidade que sempre demonstrou.

- Ao José Diogo, André Alves, Ana Marta, André Carneiro, Nuno Azevedo e Adriano Ribeiro por toda a motivação e por todos os momentos relaxantes que me proporcionaram.

- Ao Pedro Moreira, Mónica Oliveira, Emídio Dias e Adolfo Campos por todos os conselhos e pela constante preocupação.

- Aos meus companheiros, Rafael Albuquerque, Gonçalo Diniz, Bernardo Leal, Nuno Pipa, Eva Marques, Joana Lalanda, Teresa Catumba, Micaela Carneiro, Bernardo Amorim, Miguel Moreira, Gonçalo Magno e António Pedro Reis que me proporcionaram neste trilho académico, a mais bela das caminhadas.

- À minha avó Rosa, tio Zé e tia Mi pelo suporte e constante motivação.

- Aos meus pais e irmãos pelo constante apoio, esforço e dedicação para me proporcionarem a melhor educação. São, sem dúvida, a base de tudo.

- Por último, mas não menos importante, a todos aqueles que de uma forma ou de outra participaram no meu percurso académico, posso afirmar que as ajudas não são grandes nem pequenas, pois a sua grandeza está na alma de quem as dá e na humildade de quem as recebe.

A todos, aqui deixo o meu Obrigado.

RESUMO

A cultura do trigo (*Triticum aestivum* L.), juntamente com a do milho e do arroz, é uma das mais importantes do mundo, pela importância que tem para a alimentação humana. As grandes evoluções nas produções, desencadeadas por estratégias muitas vezes revolucionárias em termos agronómicos, tiveram como principal objetivo satisfazer as necessidades alimentares em todas as nações, sobretudo nas menos desenvolvidas do planeta. Infelizmente, a desnutrição é a principal causa de mortalidade, responsável por mais de 20 milhões de mortes por ano, tornando-se assim pertinente adequar os modos de produção às necessidades nutritivas da população mundial. Agora, mais do que nunca, a agricultura deve reformular políticas que, para além de fornecer as calorias necessárias, garantam todos os nutrientes essenciais para uma boa saúde nutricional. Considerando a prevista diminuição da disponibilidade de água, todas as práticas agronómicas que permitam melhorar o crescimento e resistência da planta a stresses bióticos e abióticos, sem prejuízo da sustentabilidade ambiental, são imprescindíveis.

Com o objetivo de enriquecer os produtos resultantes da cultura do trigo, nomeadamente grão e palhas, assim como conferir maior robustez ao desenvolvimento das plantas, foram testadas duas concentrações de selénio (Se; 2,5 e 25 mM) e duas de zinco (Zn; 0,012 e 0,024 mM). Os ensaios foram realizados em condições de campo, através de tratamentos *priming*, no *campus* da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. A análise de biomassa produzida e os efeitos fisiológicos foram avaliadas em datas distintas do ciclo vegetativo.

A preparação de sementes com Se melhorou o crescimento em altura e a biomassa acumulada pelas plantas. Em contrapartida, as taxas fotossintéticas não foram significativamente distintas entre os tratamentos. Quanto à influência da aplicação de Zn, ambas as concentrações testadas mostraram-se supra ótimas relativamente ao tratamento controlo, induzindo menor taxa fotossintética e afetando igualmente o tamanho das plantas e o respetivo desenvolvimento.

Palavras-chave: Biofortificação; biomassa; fotossíntese; selénio; trigo; zinco.

ABSTRACT

Wheat (*Triticum aestivum* L.), together with maize and rice, is one of the most important crops in the world because of its importance for human consumption. The great evolutions in wheat yield, triggered by strategies often revolutionary, had as main objective to satisfy the alimentary needs in all the nations, mainly in less developed countries. Unfortunately, malnutrition is the leading cause of death, accounting for more than 20 million deaths per year, making it appropriate to adjust production methods to the nutritional needs of the world's population. Now, more than ever, agriculture must reform policies that, in addition to providing the necessary calories, guarantee all essential nutrients for good nutritional health. In addition, considering the expected decrease in water availability, all agronomic practices that improve plant growth and resistance to biotic and abiotic stresses, without compromising environmental sustainability, are essential.

In order to enrich the products resulting from wheat cultivation, namely grain and straws, as well as to give greater robustness to the development of plants, two concentrations of selenium (Se; 2,5 and 25 mM) and two concentrations of zinc (Zn, 0,012 and 0,024 mM) were tested under field conditions. The trials were carried out in field conditions, through priming treatments, on UTAD campus. The analysis of biomass, yield and some physiological variables were evaluated in two different stages.

Selenium seed priming improved height and plant dry weight. In contrast, photosynthetic rates were not significantly different between treatments. Meanwhile, both concentrations of Zn tested were detrimental relatively to the control treatment, lowering net photosynthetic rate, and affecting the size of the plants and their development.

Keywords: Biofortification; biomass; photosynthesis; selenium; wheat; zinc.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS V
RESUMO VI
ABSTRACT VII
ÍNDICE DE FIGURAS X
ÍNDICE DE QUADROS XI
SÍMBOLOS E ABREVIATURAS XII
CAPÍTULO I
1. Introdução Geral e Objetivos 2
CAPÍTULO II
2. O trigo 5
2.1. Evolução da cultura 5
2.2. O grão e os seus benefícios na alimentação 7
2.3. Morfologia 8
2.4. Ciclo vegetativo 12
2.5. Fatores ambientais que afetam o desenvolvimento 15
CAPÍTULO III
3. Biofortificação 18
3.1. Zinco (Zn) 20
3.1.1. Comportamento nos solos 20
3.1.2. Comportamento nas plantas 22
3.1.3. Importância do Zinco na saúde humana 23
3.2. Selénio (Se) 25
3.2.1. Comportamento nos solos 25
3.2.2. Comportamento nas plantas 26
3.2.3. Importância do Selénio na saúde humana 27
CAPÍTULO IV
4. Material e métodos 29
4.1. Material vegetal 29
4.2. Caracterização dos ensaios 29
4.2.1. Localização e caracterização do solo 29
4.2.2. Dispositivo experimental 30
4.3. Métodos 30

4.3.1. Expressão vegetativa 30
4.3.2. Análise de parâmetros fisiológicos 30
4.3.2.1. Índice de área foliar 31
4.3.2.2. Estimativa dos teores em clorofila 32
4.3.2.3. Trocas gasosas 32
4.3.2.4. Fluorescência da clorofila *a* 33
4.4. Análise estatística 34
CAPÍTULO V
5. Resultados 36
5.1. Expressão vegetativa 36
5.2. Índice de área foliar 37
5.3. Teores de clorofila 39
5.4. Trocas gasosas 39
5.5. Fluorescência da clorofila *a* 40
CAPÍTULO VI
6. Discussão 43
6.1. Selénio 43
6.2. Zinco 47
CAPÍTULO VII
7. Conclusões 52
BIBLIOGRAFIA 53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Produção mundial de trigo no período de 1994 a 2004 (Adaptado de FAOSTAT, 2017). _ 6

Figura 3: Produção de trigo nos principais países produtores (Adaptado de FAOSTAT, 2017). ____ 6

Figura 2: Produção de trigo entre os continentes em 2014 (Adaptado de FAOSTAT, 2017). _____ 6

Figura 4: Produção de trigo em Portugal no período de 1994 a 2014 (Adaptado de FAOSTAT, 2017). _____ 7

Figura 5: Composição básica do grão de trigo (Adaptado de Bowden et al., 2007). _____ 8

Figura 6: A planta de trigo, evidenciando os sistemas radiculares primários e secundários (Adaptado de Bowden et al., 2007). _____ 9

Figura 7: Estrutura da folha (Adaptado de Bowden et al., 2007). _____ 10

Figura 8: Estrutura de uma espiga e espigueta (Adaptado de Bowden et al., 2007). _____ 10

Figura 9: Grão de trigo (Adaptado de Bowden et al., 2007). _____ 11

Figura 10: Ciclo vegetativo do trigo com as fases de desenvolvimento seguindo a escala de Zadoks (Adaptado de Sementes Webber, 2018). _____ 13

Figura 11: Relação entre o pH e a quantidade de nutrientes e micronutrientes (Adaptado de McCauley et al., 2009). _____ 21

Figura 12: Campus da UTAD (Google Earth Pro, 2018) com ampliação da respetiva parcela usada no estudo. _____ 29

Figura 13: Remoção manual de infestantes entre os talhões de trigo. _____ 30

Figura 14: Medição do índice de área foliar com recurso a um ceptómetro. _____ 31

Figura 15: Avaliação dos pigmentos clorofilinos com recurso a um medidor CCM-300. _____ 32

Figura 16: Medição das trocas gasosas com recurso a um analisador de gás por radiação infravermelha (IRGA). _____ 33

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1: Resumo das análises de solo relativas à parcela em estudo. 29

Quadro 2: Altura (cm) e número de caules, folhas e espigas por planta em resposta a diferentes concentrações de selénio e zinco. Resultados relativos à colheita 161 DAS, no momento em que ocorre a fase de floração. Os valores expressam a média ± erro padrão. 36

Quadro 3: Peso seco total (mg) e peso seco dos diferentes órgãos da planta (mg) em resposta a diferentes concentrações se selénio e zinco. Resultados relativos à colheita 161 DAS, no momento em que ocorre a fase de floração. Os valores expressam a média ± erro padrão. 37

Quadro 4: Índice de área foliar (LAI; $m^2\ m^{-2}$) em resposta a diferentes concentrações de selénio e zinco. Resultados relativos às medições realizadas 119, 122, 131 e 145 DAS, momento em que ocorre a fase de encanamento. Os valores expressam a média ± erro padrão. 38

Quadro 5: Índice de área foliar (LAI; $m^2\ m^{-2}$) em resposta a diferentes concentrações de selénio e zinco. Resultados relativos à média do período 119 a 145 DAS, momento em que ocorre a fase de encanamento. Os valores expressam a média ± erro padrão. 38

Quadro 6: Teor de clorofila (mg m^{-2}) em resposta a diferentes concentrações de selénio e zinco. Resultados relativos às medições realizadas 145 DAS, momento pós encanamento. Os valores expressam a média ± erro padrão. 39

Quadro 7: Taxa de assimilação líquida de CO_2 (A), condutância estomática (g_s), eficiência intrínseca do uso da água (A/g_s), razão entre as concentrações de CO_2 nos espaços intercelulares e na atmosfera (C_i/C_a) e taxa de transpiração (E) em resposta a diferentes concentrações de selénio e zinco. Resultados relativos às medições realizadas 145 DAS, momento pós encanamento. Os resultados expressam a média ± erro padrão. 40

Quadro 8: Eficiência quântica máxima (F_v/F_m), eficiência fotoquímica do PSII à luz (F'_v/F'_m), rendimento efetivo do PSII (Φ_{PSII}), taxa de transporte de eletrões (ETR, μmol $e^-\ m^{-2}\ s^{-1}$), coeficiente de extinção fotoquímica (qP) e coeficiente de extinção não fotoquímica (NPQ) em resposta a diferentes concentrações de selénio e zinco. Resultados relativos às medições realizadas 145 DAS, momento pós encanamento. Os valores expressam a média ± erro padrão. 41

SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

A ..... Taxa de fotossíntese líquida

a.C ..... antes de Cristo

A/g_s ..... Eficiência intrínseca do uso da água

C_i/C_a ..... Razão entre a concentração do CO_2 nos espaços intercelulares e na atmosfera

E ..... Taxa de transpiração

ETR ..... Taxa de transporte de eletrões

F'_v/F'_m ..... Eficiência fotoquímica do PSII à luz

F_m ..... Fluorescência máxima

F_v ..... Fluorescência variável

F_v/F_m ..... Eficiência fotoquímica máxima do PSII

g_s ..... Condutância estomática para o vapor da água

LAI ..... Índice de área foliar

N ..... Azoto

NPQ ..... Coeficiente de extinção não-fotoquímica

PPFD ..... Densidade de fluxo fotónico fotossinteticamente ativo

PSII ..... Fotossistema II

Se ..... Selénio

Zn ..... Zinco

CAPÍTULO I

1. Introdução Geral e Objetivos

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é considerado uma das culturas mais importantes do mundo, não só por ter sido uma das primeiras a ser domesticada (Badr e El-Shazly, 2012), mas também pela importância que tem para a alimentação humana (Shiferaw *et al*., 2013). Para além de ser a base dos produtos panificados, o trigo é muito valorizado para outros fins alimentares por ser uma fonte extremamente importante de fibras e nutrientes minerais. Em situações de crises humanitárias provocadas por catástrofes ambientais e guerras, a farinha de trigo é estrategicamente aquela que mais rapidamente chega às populações flageladas (Shiferaw *et al*., 2013). O sucesso da cultura do trigo, como qualquer outra, resulta da interação de fatores genéticos, ambientais e sistemas de cultivo, encarregando-se este último pelas maiores diferenças nas produtividades (Shiferaw *et al*., 2013). Nos últimos anos, fruto de um melhoramento genético muito focado, combinado com práticas agrícolas mais adequadas, os índices produtivos aumentaram, com todas as vantagens que daí resultam para se suprir as necessidades alimentares da população mundial, sobretudo nas regiões do globo mais subnutridas e infelizmente com tendência para aumentar (Coco, 2013).

A "Biofortificação" é um termo usado para expressar o processo que leva ao aumento do teor em nutrientes essenciais nas plantas ao longo do seu desenvolvimento. Através do uso de várias técnicas, como práticas tradicionais ou biotecnologia moderna, os rendimentos de produção são potencializados em paralelo com a biodisponibilidade de nutrientes nas plantas (Bagde e Borkar, 2013). Em geral, as plantas apresentam ótimos de desenvolvimento que são delimitados pela deficiência ou excesso de um determinado nutriente mineral. Nestas situações, o desenvolvimento das plantas é prejudicado e o valor nutritivo das suas colheitas é igualmente desvalorizado (Rodrigues, 1997). Uma vez que a cultura do trigo, principalmente o grão e as suas palhas, é também muitas vezes utilizada na alimentação animal e a sua colheita depende do tipo de maquinaria, plantas com características mais nutritivas são igualmente pretendidas.

Com o objetivo de avaliar o desenvolvimento e comportamento fisiológico da cultura do trigo, foram realizados ensaios de campo com a aplicação em diferentes doses de dois micronutrientes. Com efeito, foram testadas duas concentrações de Se (2,5 e 25 mM) e duas de Zn (0,012 e 0,024 mM), aplicadas via "priming" de sementes. As diferentes soluções utilizadas no tratamento de sementes resultaram da diluição de selenato de sódio (Na_2SeO_4) e de sulfato de zinco ($ZnSO_4$) em água destilada. No presente trabalho foram avaliados diversos parâmetros de crescimento, como a altura e a biomassa das plantas. De forma a obtermos um conhecimento mais detalhado sobre como cada nutriente atua e o impacto que este poderá causar nas plantas,

foram também avaliados parâmetros de trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* e teores de clorofila.

CAPÍTULO II

2. O trigo

2.1.Evolução da cultura

A cultura do trigo é uma das mais antigas do mundo e teve origem na Turquia, onde foram encontrados os primeiros achados arqueológicos com mais de 10 mil anos (Sampaio, 1990; Dubcovsky e Dvorak, 2007). O trigo é uma espécie anual que pertence ao género *Triticum* L., que inclui o trigo mole (*Triticum aestivum* L.) e o trigo duro (*Triticum turgidum* L.) (Bowden *et al.*, 2007). As primeiras variedades cultivadas foram diplóides e tetraplóides, com o genoma AA e AABB, respetivamente. A partir destas, apareceram as variedades hexaplóides, as quais se destinam essencialmente à produção de farinha para panificação (Mourinho, 2016).

Nos primórdios do seu uso na alimentação humana, o consumo de trigo era feito em forma de papa, misturado com frutas e peixe (Conab, 2017). Só mais tarde, há cerca de 6 mil anos, os egípcios descobriram o processo de fermentação dos cereais e desta forma começaram a fabricar pão com a farinha de trigo (Sampaio, 1990; Conab, 2017). Desde então, a cultura de trigo espalhou-se pelo mundo e 2 mil anos a.C. já os chineses o utilizavam para elaborar farinha, macarrão e pastéis (Conab, 2017).

A adaptação do trigo a cada ambiente está dependente da interação entre as características genéticas da espécie e do meio ambiente (Coco, 2013). Na Europa, a cultura desenvolveu-se inicialmente nos países mais a norte, em regiões mais frias, nomeadamente na Rússia e Polónia (Conab, 2017) que, como hoje acontece, são os que possuem melhores condições edafoclimáticas (Sampaio, 1990). A chegada ao continente americano ocorreu apenas no século XV (Conab, 2017).

A "Revolução Verde" ocorreu na década de 60 do século XX e enquadrava-se num programa de inovação tecnológica do setor agrícola que visava aumentar a produtividade através de estratégias que incluíam a modificação de sementes, a fertilização do solo, a utilização de produtos fitossanitários e a mecanização (Fitzgerald-Moore e Parai, 1996). A "Revolução Verde" foi assim uma das medidas que impulsionou o consumo de trigo a um ritmo superior, quando comparado com todos os outros cereais (Kearney, 2010).

Coco (2013) afirmou que um possível aumento das produções nas últimas décadas se devia, notavelmente, à obtenção de novas variedades levada a cabo pelo melhoramento genético. Acrescentou ainda que estes aumentos resultaram também de mudanças importantes nos modos de cultivo, especialmente no uso da rega, na maior intensificação cultural (*inputs*) e no uso de tecnologias e de programas técnicos mais adequados.

Hoje em dia, o trigo é um dos cereais mais produzidos do mundo (Shewry, 2009; Cappellari, 2012). Anualmente, cerca de 220 milhões de hectares são cultivados e, dependendo das condições edafoclimáticas, mais de 670 milhões de toneladas são produzidas. Estes valores refletem o aumento de produção de aproximadamente 200 milhões de toneladas que se verificou nos últimos 20 anos (Figura 1), tornando-se assim uma das culturas mais importantes para a segurança alimentar mundial (Galinha *et al.*, 2013; Shiferaw *et al.*, 2013; FAOSTAT, 2017).

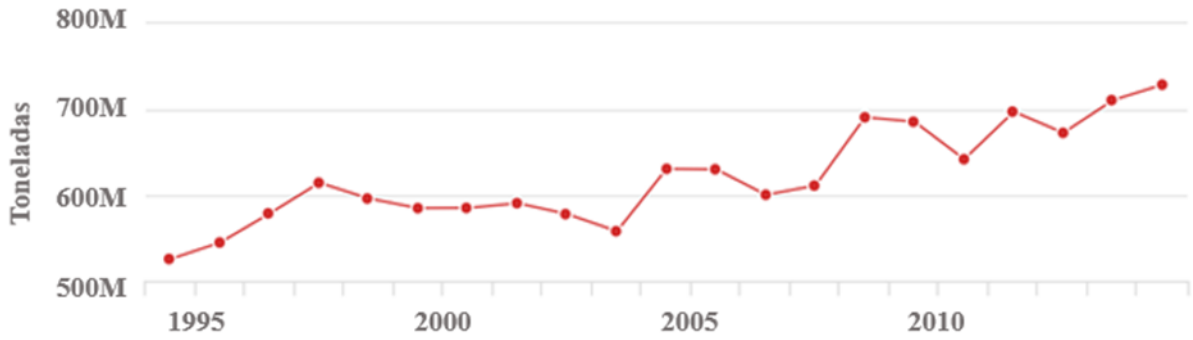

Figura 1: Produção mundial de trigo no período de 1994 a 2004 (Adaptado de FAOSTAT, 2017).

Segundo valores indicados pela FAOSTAT (2017), a produção mundial distribui-se de uma forma heterogénea entre os continentes (Figura 2), estando a Ásia no topo da lista com cerca de metade da produção mundial, seguindo-se a Europa. A América ocupa o terceiro lugar e por último a Oceânia e África, respetivamente. Em relação aos maiores produtores atuais (Figura 3), os países que lideram são a China, Índia, Rússia, Estados Unidos da América e França, por ordem decrescente.

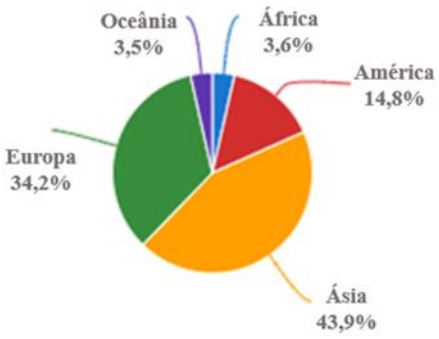

Figura 2: Produção de trigo entre os continentes em 2014 (Adaptado de FAOSTAT, 2017).

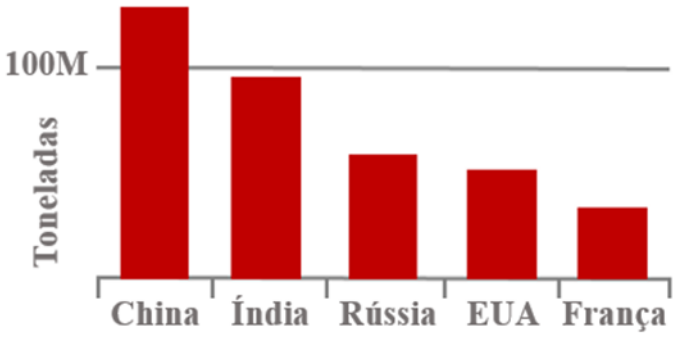

Figura 3: Produção de trigo nos principais países produtores (Adaptado de FAOSTAT, 2017).

Coco (2013) admitiu que em Portugal, à semelhança do que acontece noutras regiões de clima mediterrânico, a disponibilidade de trigo, ao longo dos anos, tem-se caracterizado por períodos de escassez devido a condições climáticas difíceis e ainda a práticas culturais deficientes (Figura 4) e, explicou ainda que: "A cultura dos cereais, afetada por condições edáficas difíceis e ainda submetidas a práticas culturais deficientes, tem-se caracterizado por rendimentos baixos e variáveis encontrando no clima um forte condicionante. Apesar destes constrangimentos, os cereais têm uma significativa importância social e económica para os portugueses, na medida em que lhes fornecem matéria-prima para o seu principal alimento, o pão, e ao mesmo tempo representam uma atividade primordial para a maioria dos agricultores com explorações agrícolas onde a produção de cereais se efetua em conjunto com a produção pecuária em regime extensivo, permitindo o aproveitamento das palhas e restolhos."

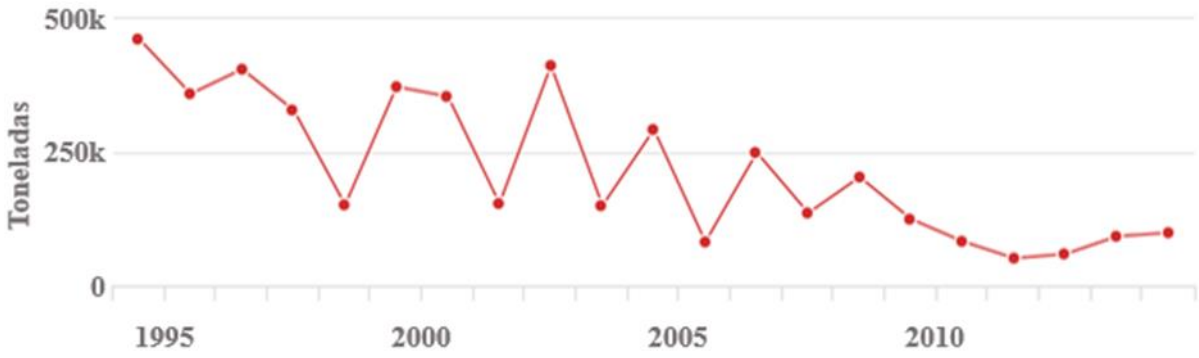

Figura 4: Produção de trigo em Portugal no período de 1994 a 2014 (Adaptado de FAOSTAT, 2017).

2.2.O grão e os seus benefícios na alimentação

O grão de trigo é rico em aminoácidos essenciais, minerais, vitaminas, fitoquímicos e fibras, sendo estes conteúdos muito valorizados, sobretudo em produtos de panificação e massas integrais (Shewry, 2009). Cada grão, devidamente formado, é constituído por 70% de hidratos de carbono, dos quais cerca de 97% é amido. O teor de proteína depende do peso do grão e, normalmente representa cerca de 8 a 15% do peso seco total (Bowden *et al.*, 2007). Estes constituintes têm um grande valor nutritivo para a alimentação humana e animal, principalmente pelos elevados teores em nutrientes e fibras do grão (Scheuer *et al.*, 2011; Cappellari, 2012). Vários estudos demonstraram que o farelo de trigo, resultante desses constituintes, pode ter efeitos benéficos na prevenção de doenças cancerígenas, cardiovasculares, gastrointestinais e distúrbios relacionados com a obesidade (Stevenson *et al.*, 2012).

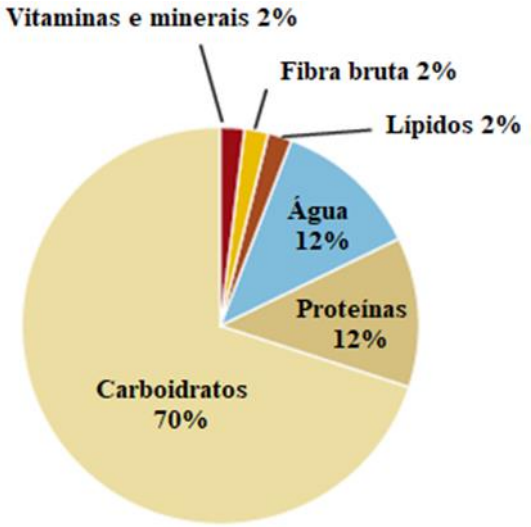

Figura 5: Composição básica do grão de trigo (Adaptado de Bowden *et al*., 2007).

Aproximadamente 95% da produção mundial de trigo é trigo mole e é usado fundamentalmente na produção de pão, biscoitos e doces. Os restantes 5% são trigo duro, usados para produzir massas e outros produtos de sêmola (Dubcovsky e Dvorak, 2007; Shewry e Hey, 2015). Os cereais, especialmente o trigo e os seus derivados, como pão, produtos de padaria, cereais de pequeno-almoço, pastas e outros, representam uma fração considerável da dieta humana (Cappellari 2012; Mourinho, 2016).

Galinha *et al.* (2013) afirmaram que o trigo fornece cerca de 20% da energia e cerca de 25% dos requisitos de proteína da população mundial. Mourinho (2016) reforçou esta constatação ao afirmar que, "apesar do trigo possuir baixo teor proteico (8-16%), comparativamente a outras fontes de alimentos, a sua elevada ingestão confere ao trigo uma boa fonte nutricional". Por sua vez, Shewry (2009) concluiu que, desta forma, a importância nutricional do trigo não deve ser subestimada, especialmente nos países menos desenvolvidos. Portugal não é exceção, uma vez que os cereais e os seus derivados apresentam um peso relativo no consumo de alimentos (Galinha *et al.*, 2013).

2.3.Morfologia

A planta de trigo apresenta várias semelhanças morfológicas quando comparada com outros cereais de inverno, nomeadamente a aveia, centeio, cevada e o triticale (Scheeren *et al.*, 2015). A sua raiz (Figura 7), que é fasciculada, tem a função de fixação e absorção de água e nutrientes minerais. As raízes primárias (raízes seminais) têm origem direta na semente em

germinação e posteriormente são substituídas pelas raízes secundárias (raízes adventícias), que se formam a partir do nó de afilhamento. A profundidade das raízes depende de vários fatores, tais como a textura do solo, a humidade, a fertilidade e a própria variedade utilizada (Sampaio, 1990).

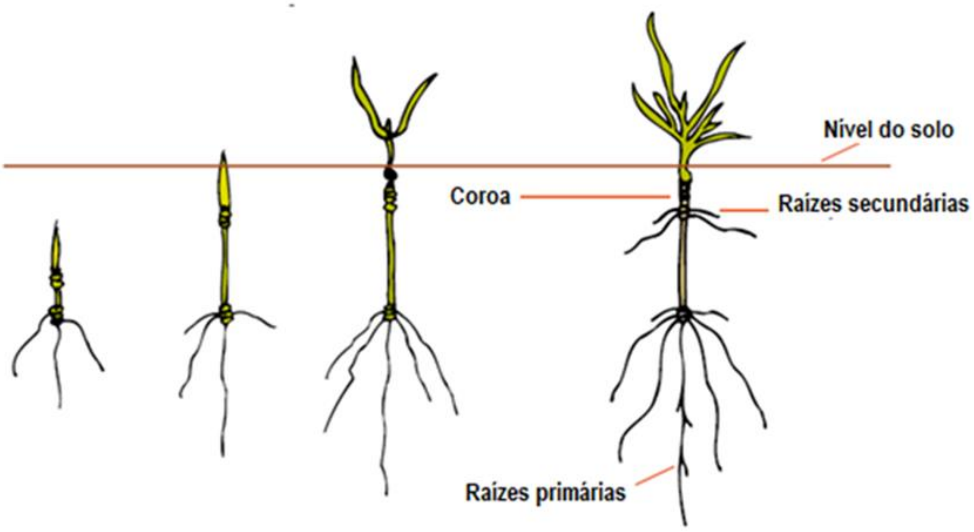

Figura 6: A planta de trigo, evidenciando os sistemas radiculares primários e secundários (Adaptado de Bowden *et al.*, 2007).

O colmo (tipo de caule em que nós e entrenós são bem visíveis) tem a função de suporte das folhas e das espigas (Sampaio, 1990). É normalmente oco, ereto, cilíndrico e apresenta quatro a sete entrenós. O comprimento dos colmos, que limita a altura das plantas, é variável e depende do tipo de variedade e das condições em que está inserida (Scheeren *et al.*, 2015). Os colmos são formados, não apenas pelo meristema terminal, mas também por meristemas intercalares, que se situam na base dos entrenós, sempre num sentido ascendente (Sampaio, 1990).

As plantas de trigo apresentam normalmente 5 a 6 folhas (Scheeren *et al.*, 2015) e estas têm uma função específica no que diz respeito aos processos vitais da fotoassimilação de carbono (Sampaio, 1990). As folhas nascem na base dos nós, são constituídas pela bainha, lâmina, lígula e um par de aurículas e têm uma forma linear e uma disposição alternada (Figura 8) (Dedecca e Púrchio, 1952; Scheeren *et al.*, 2015). No início do ciclo vegetativo apresentam uma cor verde e com o passar do tempo esta é alterada para verde-amarelada, depois amarela e por fim apresentam um tom acinzentado (Sampaio, 1990). Vários parâmetros como o número, tamanho, forma e posição das folhas são importantes para a caracterização das cultivares (Scheeren *et al.*, 2015).

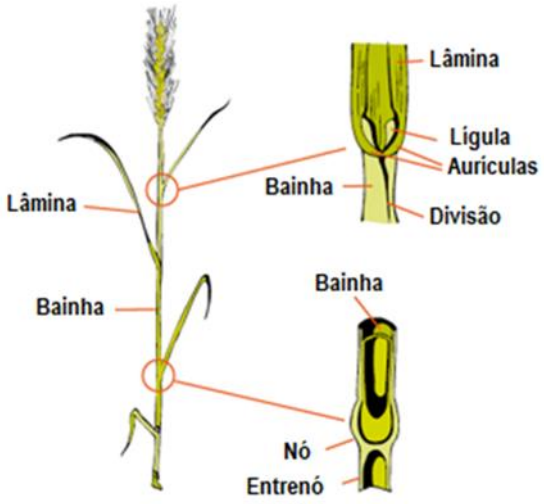

Figura 7: Estrutura da folha (Adaptado de Bowden *et al.*, 2007).

A inflorescência do trigo (Figura 9) é uma espiga dística, constituída por um conjunto de espiguetas distribuídas alternadamente e, em geral, terminada por uma espigueta fértil (Dedecca e Púrchio, 1952; Sampaio, 1990). Geralmente cada espiga apresenta entre 22 a 34 espiguetas, sendo este número dependente da variedade e dos fatores edafoclimáticos. As espiguetas são compostas por 3 a 9 flores, dispostas alternadamente e envolvidas pelas glumas. As espigas têm diversas formas, designadamente fusiforme, quando estreita para a proximidade, elipsoide, quando é curta e quase arredondada uniformemente nas duas extremidades, piramidal, se for curta e mais grossa na base do que na ponta, e caviforme aclavada, quando é mais grossa na ponta do que na base (Sampaio, 1990). Estas diversas formas são importantes botanicamente pois servem de referência na diferenciação de cultivares (Scheeren *et al.*, 2015).

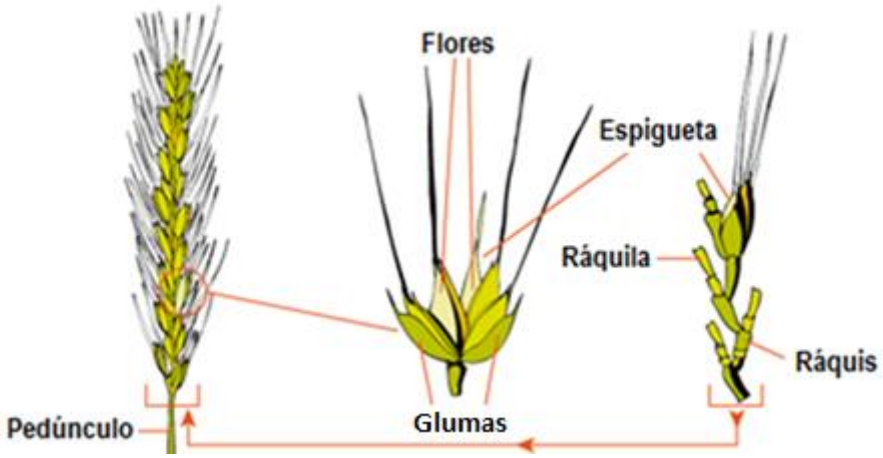

Figura 8: Estrutura de uma espiga e espigueta (Adaptado de Bowden *et al*., 2007).

Botanicamente, o fruto de trigo é uma cariopse (Figura 5) a que vulgarmente chamamos semente (Sampaio, 1990). Forma-se apenas um grão a partir de cada flor. O seu formato é variável, desde grãos estreitos e compridos a grãos curtos e arredondados (Scheeren *et al*., 2015). Normalmente, cada grão tem de 6 a 8 milímetros de comprimento e 3 a 4 milímetros de largura (Scheuer *et al*., 2011). O fruto pode ser amplamente dividido em três constituintes: o embrião (3%), o pericarpo juntamente com a camada de aleurona (14%) e o endosperma ou albúmen (83%) (Sampaio, 1990; Bowden *et al.,* 2007; Stevenson *et al.,* 2012). O pericarpo, rico em fibras e sais minerais, constitui a camada mais externa e protetora do grão (Scheuer *et al.*, 2011). A aleurona é uma camada proteica que envolve o endosperma (Sampaio, 1990; Evers e Millar, 2002; Farooq *et al*., 2014) e segrega enzimas para hidrolisar as reservas de amido aí armazenadas (Bowden *et al.,* 2007). Este amido constitui a fonte primordial de açúcares solúveis para as primeiras etapas da germinação da semente, nomeadamente para a atividade respiratória do crescimento do embrião/plântula, até que as raízes desta se estabeleçam e as primeiras folhas adquiram capacidade fotossintética (Bowden *et al.,* 2007; Scheuer *et al*., 2011). O embrião contém os principais primórdios da planta. É constituído pelo escutelo, plúmula e radícula (Bowden *et al.,* 2007).

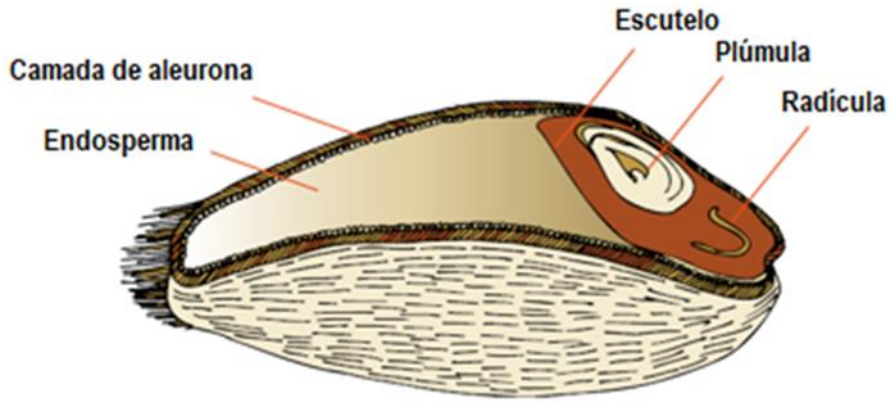

Figura 9: Grão de trigo (Adaptado de Bowden *et al.*, 2007).

O escutelo é uma estrutura em forma de escudo que absorve os açúcares solúveis da degradação de amido no endosperma. Também segrega algumas enzimas envolvidas na germinação. A plúmula e a radícula são partes da semente que dão origem às primeiras folhas e à raiz principal, respetivamente (Bowden *et al*., 2007).

2.4.Ciclo vegetativo

O crescimento e desenvolvimento da cultura do trigo é um processo bastante complexo. Durante o seu ciclo de vida há várias fases de desenvolvimento que se sobrepõem e, enquanto um tecido ou parte da planta se está a desenvolver, outra pode estar a morrer (Bowden *et al.*, 2007). As fases de desenvolvimento do trigo são então definidas pela diferenciação dos diferentes órgãos, podendo estas ser definidas através de mudanças morfológicas internas ou externas (Slafer e Rawson, 1994; Coco, 2013). O período de cada fase de desenvolvimento depende fundamentalmente de vários fatores genéticos (genótipo), ambientais (temperatura, humidade e fotoperíodo) e agronómicos (data de sementeira, densidade de sementeira, fertilização do solo, infestantes, etc.) (Slafer e Rawson, 1994; Coco, 2013).

Uma gestão adequada das práticas culturais depende da identificação precisa de cada fase de crescimento, permitindo assim que o impacto de fatores adversos, como a geada, calor, seca, doenças, pragas e infestantes possa ser controlado de uma forma mais eficiente. Em consequência, este domínio permite definir o melhor tempo para a aplicação de fertilizantes, herbicidas, inseticidas e rega (Fowler, 2016). Deste modo, as escalas de crescimento tornam-se ferramentas valiosas uma vez que fornecem uma referência comum para agricultores, agrónomos, investigadores e outros profissionais agrícolas no reconhecimento de cada fase (Bowden *et al*., 2007) sem que haja necessidade de destruir a planta para fazer essa monitorização (Coco, 2013). Entre estas destacam-se as escalas de Haun, Feekes e a de Zadoks, sendo esta última a mais usada na Europa (Bowden *et al.*, 2007; Coco, 2013; Fowler, 2016). Esta escala baseia-se num código que revela o ponto de desenvolvimento da planta e é representada por um conjunto de dois números. O primeiro varia de 0 a 9, relativo à fase principal de desenvolvimento, e o segundo, também com valores entre 0 e 9, oferece uma informação mais detalhada para cada uma das fases de desenvolvimento, onde o 5 corresponde a um valor intermédio. Estes códigos numéricos são sempre precedidos pelas letras GS que significam “Growth Stage” (Zadoks *et al.*, 1974; Bowden *et al.*, 2007; Coco, 2013).

Fisiologicamente, na escala de Zadoks as fases de desenvolvimento (Figura 10) são normalmente distinguidas como: germinação (00-09), emergência (10-19), afilhamento (20-29), alongamento (30-39), emborrachamento (40-49), emergência da inflorescência (50-59), floração ou ântese (60-69), desenvolvimento do grão leitoso (70-79), desenvolvimento do grão pastoso (80-89) e maturação fisiológica (90-99) (Zadoks *et al.*, 1974; Tottman, 1987; Bowden *et al.*, 2007; Fowler, 2016).

O conjunto destas fases denomina-se por *ciclo vegetativo*. De acordo com vários autores, podem nesse conjunto ser identificados três períodos de desenvolvimento distintos: Sampaio (1990) dividiu as diferentes fases em período vegetativo, período de reprodução e período de maturação, enquanto Galinha (2011) destacou as fases principais como fase de afilhamento, de emborrachamento e de enchimento do grão; outros autores, como Monteiro (2009) e Coco (2013), distinguiram-nas como período vegetativo, período reprodutivo e período de enchimento do grão.

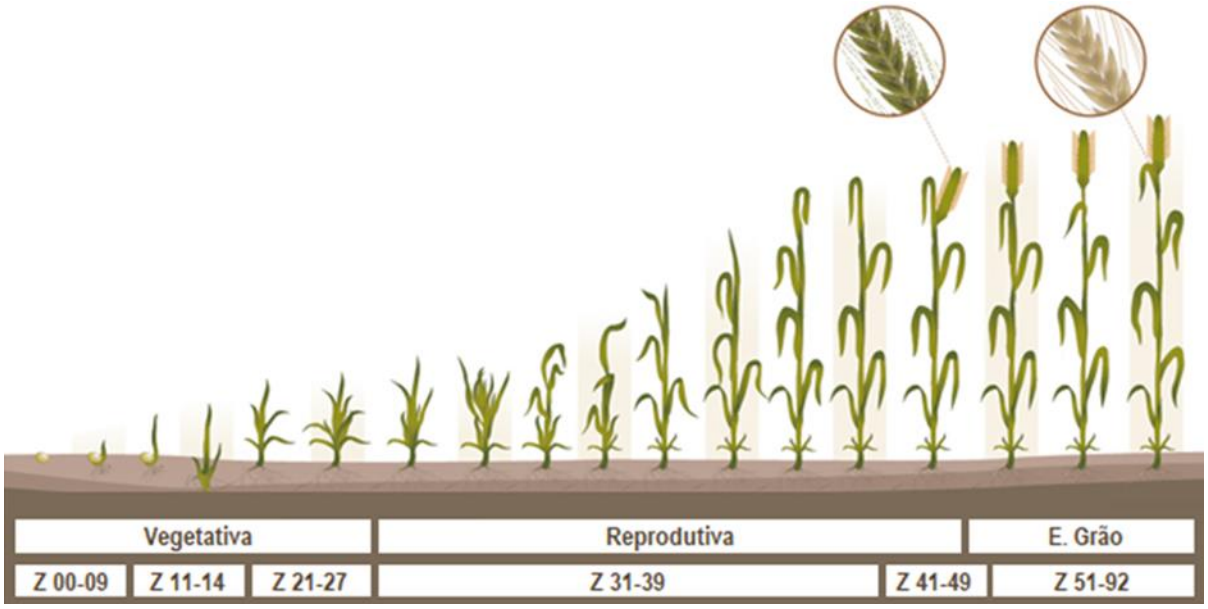

Figura 10: Ciclo vegetativo do trigo com as fases de desenvolvimento seguindo a escala de Zadoks (Adaptado de Sementes Webber, 2018).

O início da fase vegetativa coincide com o início da germinação (Monteiro, 2009; Coco, 2013). Esta começa no momento em que a semente absorve água e atinge cerca de 35 a 45% do seu peso seco (Bowden *et al.*, 2007; Fowler, 2016). Depois do embrião atingir a plena hidratação, este produz hormonas de crescimento que estimulam a atividade enzimática, onde a presença de oxigénio é indispensável para incrementar a respiração celular (Sampaio, 1990). As enzimas hidrolisam o amido e proteínas em açúcares e aminoácidos para assegurar o desenvolvimento do embrião. Após a rotura do tegumento, o embrião começa a crescer, designadamente o crescimento da radícula e a emergência do coleóptilo (Bowden *et al.*, 2007). Esta emergência ocorre logo que o coleóptilo rompe a superfície do solo e a primeira folha se torne visível. Logo que as folhas já estejam separadas e a raiz minimamente desenvolvida, a planta apresenta autonomia para se desenvolver autotroficamente (Sampaio, 1990; Bowden *et*

al., 2007). A partir desta fase, o eixo primário continua a crescer de forma lenta, formando-se os filhos (caules auxiliares) a partir das axilas das primeiras folhas (Sampaio, 1990; Bowden *et al.*, 2007) e, a partir das axilas dos filhos primários, os filhos secundários e assim consecutivamente (Galinha, 2011; Coco, 2013). A esta fase dá-se o nome de *afilhamento* e, em termos agronómicos, apresenta uma elevada importância, uma vez que, apesar de nem todos os filhos darem origem a uma espiga (Bowden *et al.*, 2007), permite uma compensação da baixa densidade de sementeira (Coco, 2013). O número de filhos depende não só do genótipo, mas também das práticas agrícolas e das condições de crescimento. O aparecimento destes termina, normalmente, antes do início do alongamento do caule (Coco, 2013) devido à competição por recursos, havendo, inclusive, a morte de alguns numa ordem inversa ao seu aparecimento (Monteiro, 2009). A iniciação floral marca o fim da fase vegetativa e o começo da reprodutiva (Monteiro, 2009). Esta nova fase é muito complexa uma vez que há uma série de processos a acontecer ao mesmo tempo (Bowden *et al.*, 2007). É aqui que começam a ser diferenciados os primórdios das espiguetas na zona central da espiga, alongando-se posteriormente para as extremidades (Monteiro, 2009). Verifica-se igualmente um rápido crescimento dos colmos, assim como o desenvolvimento do sistema radicular e o término da expansão das folhas superiores. Todos estes órgãos em crescimento competem por fotoassimilados, os quais vão influenciar o desenvolvimento das inflorescências e o seu rendimento (Coco, 2013). No momento da ântese (fim da fase reprodutiva) já o número de espigas está definido (Coco, 2013). A fase de enchimento do grão, que encerra a fase reprodutiva da planta, começa na ântese e vai até à sua maturidade fisiológica (Bowden *et al.*, 2007; Monteiro, 2009; Galinha, 2011; Coco, 2013). O desenvolvimento do grão divide-se em três fases (Farooq *et al.*, 2014), designadamente:

- Na primeira fase, após a fertilização das flores, a semente aumenta rapidamente de tamanho (Bowden *et al.*, 2007), uma vez que as células do endosperma se dividem e expandem rapidamente (Coco, 2013). É neste momento que o órgão está pronto a ser preenchido por substâncias de reserva, principalmente amido (Bowden *et al.*, 2007).

- Na segunda fase, a do preenchimento do grão, o crescimento é constante à medida que os hidratos de carbono e as proteínas se vão acumulando no endosperma. Esta acumulação no endosperma continua enquanto o grão passa de um estado leitoso para

um estado pastoso. A determinação desses estados é feita pela quantidade de solutos acumulados (Bowden *et al.*, 2007).

- Finalmente, o sistema vascular, que fornece água e nutrientes ao grão, é bloqueado por uma substância cerosa (Bowden *et al.,* 2007). O grão para de crescer e fica acastanhado, depois seca até atingir um teor de humidade de 12% quando está pronto para ser colhido (Bowden *et al*., 2007). Visualmente, a maturidade completa é considerada quando a folha bandeira e as espigas ganham uma cor amarela (Acevedo *et al.,* 2002).

2.5. Fatores ambientais que afetam o desenvolvimento

Os principais fatores que afetam o desenvolvimento do trigo são a temperatura e o fotoperíodo (Acevedo *et al.,* 2002; González *et al.,* 2002; Alberto *et al.,* 2009). Contudo, outros fatores como a nutrição mineral, a data de sementeira, a densidade de plantas, a disponibilidade de água e de radiação podem interferir no processo de desenvolvimento de algumas fases (Franceschi, 2009; Valério *et al.,* 2009).

Os trigos de inverno apresentam uma forte resposta à vernalização e têm necessidade de um período de frio, normalmente entre 0 e 7ºC num período de 30 a 60 dias, para adquirir capacidade de floração (Acevedo *et al.,* 2002). A vernalização pode ocorrer durante a germinação, durante o crescimento vegetativo e durante a formação de sementes na planta-mãe (Acevedo *et al.,* 2002). Nos estados iniciais de crescimento, o trigo apresenta uma grande resistência às geadas, uma vez que só as folhas estão expostas e apresentam grande tolerância, mas com o passar do tempo essa resistência vai-se perdendo devido ao alto conteúdo hídrico e à baixa concentração de solutos existentes nas células (Souza e Silva, 2013). Já os trigos de primavera não necessitam de um período de vernalização, uma vez que a resposta às baixas temperaturas é muito suave ou até mesmo nula. Estes apenas requerem temperaturas entre 7 e 18ºC num período de 5 a 15 dias para que ocorra indução floral (Acevedo *et al.,* 2002).

A sensibilidade ao fotoperíodo difere entre genótipos, embora a grande parte de trigos cultivados sejam plantas de dias longos (Souza e Silva, 2013) e apresentem um ótimo quando o dia-luz excede as 14 horas (Sampaio, 1990). O fotoperíodo é detetado por folhas maduras e uma única folha é normalmente suficiente para detetar o fotoperíodo e promover a indução floral (Acevedo *et al.,* 2002).

A data de sementeira, quando atrasada, encurta o ciclo vegetativo e pode acelerar o processo de senescência das folhas. Para além disso, também causa um decréscimo na taxa de afilhamento, comprometendo o número de inflorescências por unidade de área e, consequentemente, a produção de grão. Apesar destes inconvenientes, existem algumas vantagens, como garantir um teor de humidade no solo mais favorável e, simultaneamente, controlar grande parte das infestantes (Calado *et al.,* 2008). Por outro lado, quando a sementeira é muito antecipada, pode permitir uma senescência mais lenta. Contudo, se a precipitação for muito abundante, pode promover um rápido crescimento inicial das plantas que posteriormente é impossível manter devido à insuficiente área fotossinteticamente ativa (Calado *et al.,* 2008).

A alta densidade de sementeira, ou uma elevada taxa de afilhamento, pode também influenciar o desenvolvimento das plantas. A falta de luz, devido ao ensombramento entre plantas, pode provocar o estiolamento das próprias plantas, principalmente na base dos colmos e folhas inferiores. Dessa forma, apesar do alongamento excessivo dos caules se manter, a quantidade de clorofila e a consequente captação de luz para a fotossíntese será insuficiente nas partes ensombradas, resultando em caules mais fracos e delgados e consequentemente mais suscetíveis a acama (Sampaio, 1990).

CAPÍTULO III

3. Biofortificação

Em termos globais, a subnutrição é a principal causa de mortalidade humana. Todos os anos é responsável por cerca de 20 milhões de mortes, das quais cerca de cinco milhões são crianças devido à deficiência em micronutrientes minerais (Bouis e Welch, 2010).

Müller e Krawinkel (2005) afirmaram que estas deficiências nas populações dependem de diversos fatores, designadamente, a situação política e económica, o nível de educação e saneamento básico, os costumes culturais e religiosos, as condições climáticas, os hábitos de amamentação, a prevalência de doenças infectocontagiosas, a produção de alimentos, a existência e eficácia de programas de nutrição e a disponibilidade e qualidade de serviços de saúde.

Durante a "Revolução Verde", o setor agrícola foi responsável pelo suprimento de alimentos para as populações mais pobres do mundo, usando, grosso modo, três culturas universalmente reconhecidas das quais se destacam o arroz (*Oryza sativa* L.), o trigo (*Triticum aestivum* L.), e o milho (*Zea mays* L.). Essas culturas satisfizeram as necessidades básicas e energéticas das populações, embora com muitas limitações, dado que alguns nutrientes minerais poderiam estar em deficiência (Bouis e Welch, 2010).

As deficiências em micronutrientes podem surgir mesmo em populações onde aparentemente não haja falta de alimentos para assegurar as necessidades energéticas fundamentais. Contudo, mesmo nestas condições, nem sempre essas dietas são suficientemente equilibradas em termos de micronutrientes, gerando consequentemente distúrbios nutricionais, apelidada como "fome escondida" (Thompson, 2007; Bagde e Borkar, 2013; Singh *et al.*, 2015). Dessa forma, a agricultura deve considerar novas políticas regulamentares que não só garantam as calorias necessárias dos produtos vegetais, mas também assegurem um adequado equilíbrio em nutrientes minerais para o bem-estar das populações (Bouis e Welch, 2010).

As plantas são a principal fonte de muitos nutrientes essenciais vitais para os seres humanos. Apesar de algumas serem ricas em alguns minerais, apresentam deficiências noutros. Tanto quanto se sabe, não existe no planeta uma única cultura capaz de, só por si, assegurar todos os elementos essenciais, pelo que todos os planos de ação para corrigir o desejado bem-estar nutricional deverá contemplar na dieta a maior diversidade possível de alimentos vegetais (Mulualem, 2015).

Frequentemente, a produção mundial de alimentos é feita em solos com teores relativamente baixos em alguns micronutrientes, o que acabará por acarretar deficiências na produtividade e qualidade nutricional dos produtos vegetais, sendo assim imperativo promover

adequada e atempadamente as devidas correções ao solo ou às próprias plantas durante o seu crescimento (Inocencio, 2014).

Biofortificar é um termo que provem da palavra grega "*bios*", que significa "*vida*", e latina "*fortificare*" que significa "*tornar forte*". A biofortificação é definida pelo processo que aumenta o conteúdo natural de nutrientes biodisponiveis nas plantas cultivadas através de práticas tradicionais de reprodução ou biotecnologia moderna (Bage e Borkar, 2013; Meena *et al.,* 2017). É neste contexto que a biofortificação se apresenta como uma solução sustentável (Bouis e Welch, 2010).

As plantas são o início da cadeia alimentar e a acumulação de nutrientes nos tecidos vegetais destas oferece benefícios para a alimentação humana e animal (Palmgren *et al.,* 2008; Masarovičová e Kráľová, 2012). Nas formas possíveis de biofortificação incluem-se a genética e a agronómica (Bagde e Borkar, 2013). A primeira envolve o melhoramento de plantas com capacidade de acumular maiores quantidades de nutrientes nos diferentes órgãos, enquanto a biofortificação agronómica mais usual faz uso de fertilizantes nos solos e diretamente nas culturas para aumentar essas concentrações (Alloway, 2009).

A eficácia da aplicação de fertilizantes no desempenho das culturas depende do tipo de fertilizante e do método de aplicação. A preparação de fertilizantes determina em grande parte a biodisponibilidade dos micronutrientes, isto porque a forma dos nutrientes e as interações entre eles podem apresentar efeitos sinérgicos, neutros ou até mesmo antagónicos no desenvolvimento das plantas e nos seus rendimentos. As fertilizações foliares são muitas vezes preferíveis quando comparadas com fertilizações diretas ao solo, dado que a imobilização dos nutrientes no solo pode tornar esta prática ineficaz. Em contrapartida, as fertilizações foliares são mais difíceis de aplicar, mais dispendiosas e podem ser facilmente lavadas pela chuva. A combinação entre fertilizações no solo e foliares é normalmente o método que apresenta resultados mais satisfatórios. O revestimento de sementes com fertilizantes é outra estratégia para a aplicação precisa de micronutrientes, que pode aumentar o desenvolvimento da planta, mas raramente são encontrados resultados na melhoria do valor nutricional (Valença *et al.,* 2017).

Alguns autores, como White e Broadley (2009), acrescentaram que a biofortificação de culturas, através da aplicação de fertilizantes, combinada com variedades de melhoramento que apresentam uma maior capacidade de absorção de elementos minerais, é definida como uma estratégia imediata, não apenas para aumentar as concentrações de minerais em culturas comestíveis, mas também para melhorar rendimentos em solos pouco férteis. Contudo, é de

salientar que este conjunto de estratégias pode não satisfazer completamente as necessidades de cada individuo. Na verdade, o sucesso da biofortificação está dependente dos alimentos básicos consumidos, da prevalência de deficiências em micronutrientes, das perdas diárias de micronutrientes e das necessidades específicas de cada individuo, como por exemplo durante a gravidez, amamentação ou até mesmo da fase de crescimento da pessoa (Bouis *et al.,* 2011).

De seguida, aborda-se o estado da arte específico dos micronutrientes que foram objeto de estudo nesta dissertação.

3.1.Zinco (Zn)

O Zinco (Zn) é um metal de transição com o número atómico 30 e é o vigésimo terceiro elemento mais abundante na terra (Broadley *et al.,* 2007). No solo, é originado a partir de fragmentos da rocha-mãe, juntamente com "*inputs*" provenientes da atmosfera e atividades agrícolas (Alloway, 2004). O Zn foi identificado por Raulin como um requisito biológico em 1869 (Alloway, 2004; Borges *et al.,* 2016). No entanto, a sua essencialidade só foi comprovada quando Sommer e Lipman mostraram em 1926 que era um elemento essencial para o desenvolvimento do girassol e da cevada (Nielsen, 2012). Desde então, o Zn passou a ser considerado um micronutriente essencial de vital importância na produção de culturas. Contudo, a sua deficiência apresenta-se mais difundida no globo do que qualquer outro micronutriente (Alloway, 2004; Nielsen, 2012).

Nos cereais, nomeadamente no trigo, o Zn apresenta-se em baixas concentrações, com apenas cerca de 20 a 35 mg Zn kg^{-1} de grão. A baixa concentração de Zn no trigo resulta em grande parte do baixo teor de Zn nos solos onde este é cultivado, estimando-se que 40% do trigo produzido seja em solos que apresentam carência neste micronutriente (Liu *et al*., 2017).

Em organismos animais a importância do Zn foi definida nas décadas de 30 e 40 do século passado, quando Wilbert Todd, Conrad Elevehjem e Edwin Hart descobriram que este elemento era essencial para o crescimento e bem-estar de ratos (Nielsen, 2012). Apenas em 1960, com estudos clássicos de deficiências em Zn, se descobriu a ocorrência de perturbações em humanos (Roohani *et al.,* 2013; Borges *et al.,* 2016).

3.1.1. Comportamento nos solos

A concentração de Zn nos solos varia entre valores de 10 a 300 mg kg^{-1}, e a concentração média global aproxima-se de 55 mg kg^{-1} (Alloway, 2004). O Zn apresenta-se na forma iónica Zn^{2+} e está adsorvido aos coloides argilo-húmicos (Schulte, 2004; Rattan *et al*., 2014). Os

principais fatores que afetam a disponibilidade de Zn são a quantidade total deste no solo, o pH e a textura do solo. Outros fatores, como a atividade microbiana na rizosfera, humidade e condições de oxirredução têm também influência na sua disponibilidade (Alloway, 2004; Schulte, 2004). Relativamente à textura dos solos, os solos arenosos e os solos orgânicos são mais suscetíveis de serem deficientes em Zn do que solos limosos ou argilosos devido a sua menor capacidade de adsorção (Schulte, 2004).

A capacidade do solo manter e fornecer nutrientes está relacionada com a capacidade de troca de catiões e aniões, ou seja, a quantidade de ligações possíveis entre os nutrientes e as partículas do solo (Figura 11). A capacidade de troca é afetada pelo pH do solo porque os iões H^+ ligam-se às cargas negativas ao longo da superfície do solo, reduzindo o número de pontos aos quais os catiões se podem ligar (McCauley *et al*., 2009).

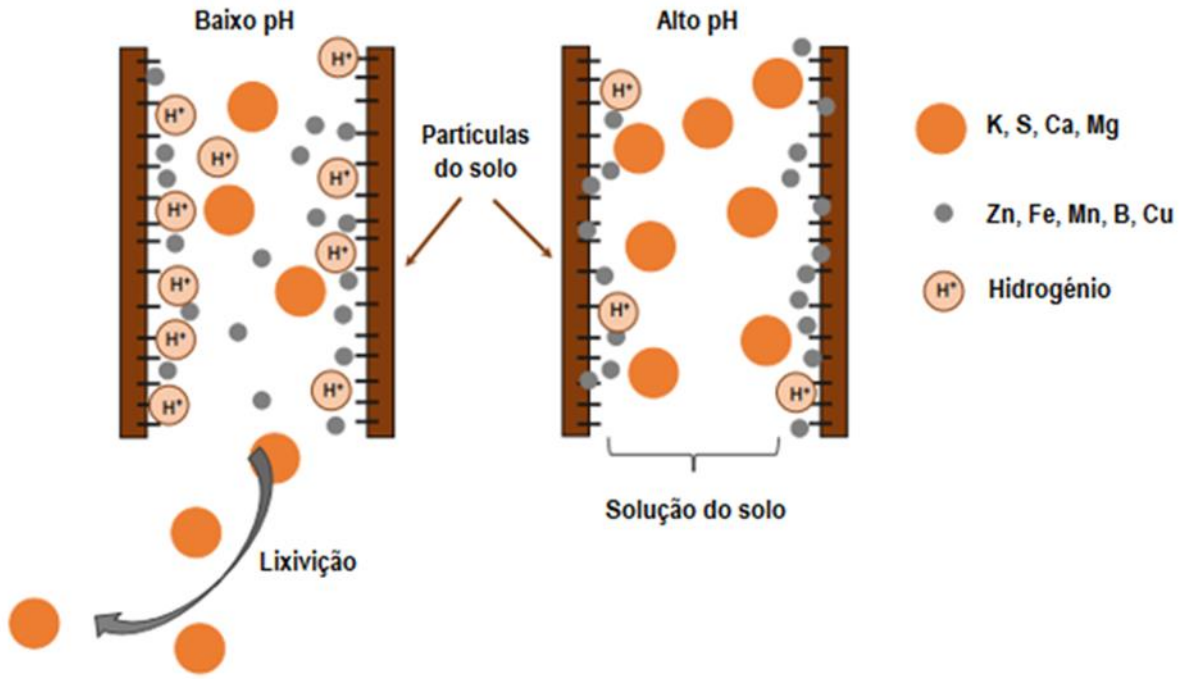

Figura 11: Relação entre o pH e a quantidade de nutrientes e micronutrientes (Adaptado de McCauley *et al*., 2009).

A disponibilidade de nutrientes depende do tamanho e da carga elétrica das moléculas destes. Uma vez que os nutrientes metálicos, como o Zn, manganês (Mn), e cobre (Cu), são pequenas moléculas com 2 ou 3 cargas positivas, apresentam uma alta relação carga/tamanho, ou seja, ligam-se fortemente à superfície do solo. Em solos com pH elevado, isto é baixa concentração de H^+, os iões metálicos ligam-se fortemente às partículas argilo-húmicas, o que

dificulta a sua disponibilidade para a absorção das plantas. Em contrapartida, em solos com pH baixo, os iões metálicos tornam-se mais disponíveis para as plantas, uma vez que as suas ligações às partículas do solo são menores devido à elevada concentração de H^+ (McCauley *et al*., 2009).

Mourinho (2016) admitiu que, através de aplicações de Zn em solos deficientes em Zn, se verificou um aumento na produção de matéria seca, produção de grãos e concentração de Zn nos grãos de trigo. Em alguns solos, os efeitos residuais de uma única aplicação de Zn podem ser visíveis ao longo de vários anos (White e Broadley, 2009).

3.1.2. Comportamento nas plantas

O Zn é geralmente absorvido como catião divalente livre, Zn^{2+}, mas com um pH elevado pode ser absorvido como catião monovalente $ZnOH^+$ (Rehman *et al.,* 2012). Na planta este elemento está envolvido na síntese de DNA e RNA e é um constituinte de enzimas específicas para o crescimento e diferenciação celular (Rehman *et al.,* 2012; Souza, 2013).

O Zn está ainda envolvido em vários processos fisiológicos do crescimento e do metabolismo da planta, incluindo a ativação enzimática, a síntese proteica, o metabolismo de hidratos de carbono, lípidos, auxinas e ácidos nucleicos, expressão e regulação genética e formação dos grãos de pólen (Alloway, 2009; Rehman *et al.,* 2012). Apresenta também um papel importante no desenvolvimento da semente (Hänsch e Mendel, 2009).

Na maioria das culturas, a concentração de Zn necessária para assegurar um crescimento adequado é de aproximadamente 15-20 mg Zn kg^{-1} de peso seco (Broadley *et al.,* 2007).

Todas as plantas são, de forma geral, suscetíveis à deficiência de Zn. Contudo, a sua resposta nestes casos e/ou quando fertilizadas com Zn varia de acordo com a espécie e/ou a variedade (Alloway, 2009; Souza, 2013). Secundariamente, outros fatores determinantes da eficiência de Zn nas plantas são o volume e o comprimento das raízes, a presença ou ausência de raízes proteoides (designação botânica e agronómica dada aos densos conglomerados de raízes laterais curtas e densamente espaçadas e que se podem desenvolver em resposta a certas deficiências nutricionais), o aumento de absorção através de micorrizas arbusculares e a reciclagem do elemento dentro dos tecidos da planta. No caso do trigo, a deficiência em Zn ocorre em solos calcários porque a solubilidade do Zn tende a ser mais baixa (Alloway, 2009).

A deficiência de Zn no trigo reduz o rendimento e a qualidade nutricional dos grãos. Os primeiros sintomas aparecem nas folhas jovens, uma vez que em condições de deficiência o zinco é relativamente imóvel na planta. A passagem de cor verde-claro a branco clorótico e

listras necróticas desenvolvidas em ambos os lados da folha são características de uma leve deficiência de Zn no trigo. Em situações onde a deficiência é mais grave, as folhas mais velhas tendem a ser totalmente cloróticas e curtas, mas de largura normal (Alloway, 2004). Outros sintomas típicos de deficiência são o encurtamento dos entrenós, a redução da altura de plantas e a quebra de produtividade (Souza, 2013).

A toxicidade em Zn nas culturas não é tão comum como a sua deficiência. Os sintomas tornam-se visíveis nas folhas com uma concentração de Zn superior a 300 mg kg^{-1} de peso seco, embora em algumas culturas os sintomas de toxicidade se possam manifestar a concentrações de Zn inferiores a 100 mg kg^{-1}. Os limiares de toxicidade podem ser altamente variáveis até mesmo dentro da mesma espécie. Entre os sintomas de toxicidade incluem-se os rendimentos reduzidos e crescimento retardado, clorose induzida por deficiência de ferro através de reduções na síntese de clorofila, degradação de cloroplastos e interferência com a absorção de fósforo, magnésio e manganês. A toxicidade em Zn varia consideravelmente entre as culturas. Por exemplo, em solos ácidos as gramíneas são menos sensíveis do que a maioria das dicotiledóneas, mas, em contrapartida, em solos alcalinos verifica-se um comportamento oposto (Broadley *et al.*, 2007).

3.1.3. Importância do Zinco na saúde humana

O Zn é um nutriente igualmente essencial para os seres humanos. Estima-se que aproximadamente 3000 proteínas do corpo humano contenham Zn. Este é o único metal envolvido em todas as seis classes de enzimas: óxido redutases, transferases, hidrólases, liases, isomerases e ligases (Alloway, 2009). O Zn desempenha um papel fundamental no crescimento e no desenvolvimento corporal, no funcionamento do sistema imunológico, na saúde reprodutiva, na função sensorial e no desenvolvimento neurológico (Mafra e Cozzolino, 2004; Alloway, 2009). Desempenha ainda um forte papel no que diz respeito à organização polimérica de macromoléculas como DNA e RNA e é fundamental para a atividade de enzimas envolvidas diretamente com a síntese destas, como por exemplo a RNA polimerase (Mafra e Cozzolino, 2004).

O corpo humano contem cerca de duas a três gramas de Zn, estando este distribuído com maior concentração no fígado, pâncreas, rins, ossos e músculos (Borges *et al.*, 2016).

Estima-se que cerca de 33% da população humana mundial sofra de deficiência de Zn, mas este valor pode variar de 4 a 73%, dependendo do país (Alloway, 2009). Souza (2013) afirmou que, em países em desenvolvimento, a deficiência de Zn é considerada o quinto fator

de risco para a saúde humana, logo após o tabagismo. De uma maneira geral, cerca de 1,4% das mortes no mundo são atribuídas à carência de Zn, sendo 1,4% nos homens e 1,5% nas mulheres.

As principais causas de deficiência de Zn são a carência alimentar, a síndrome da má absorção ou a dieta composta, essencialmente, à base de vegetais (Borges *et al.*, 2016).

Nos humanos, o Zn é considerado um nutriente do "tipo 2", o que significa que a concentração no sangue não diminui proporcionalmente ao grau de deficiência. Como resultado, o crescimento físico diminui e a excreção é reduzida para aumentar a conservação de Zn. As doses diárias recomendadas variam entre 3 e 16 mg dia^{-1}, dependendo da idade, género, tipo de dieta e outros fatores (Alloway, 2009), sendo normalmente recomendado 8 mg dia^{-1} para as mulheres e 11 mg dia^{-1} para os homens (Borges *et al.*, 2016).

O Zn é absorvido no corpo através do intestino delgado, que também regula a homeostasia do corpo inteiro através de mudanças tanto na absorção a nível fracionado de Zn dietético como na excreção de Zn endógeno em suco pancreático e outras secreções gastrointestinais. Vários fatores favorecem a absorção, tais como a glicose, a lactose, a proteína de soja e o vinho tinto. Também a alimentação à base de carnes facilita a absorção devido à libertação de aminoácidos e peptídeos contendo cisteína durante a digestão, formando complexos solúveis como o Zn (Borges *et al.*, 2016).

Rosado *et al.* (2009) relataram que, no caso específico do trigo, onde grande percentagem de Zn presente no grão é perdida com a remoção da camada de aleurona e embrião durante o processo de moagem, a ingestão de Zn foi substancialmente maior para humanos que consumiram trigo biofortificado, relativamente aos que consumiram trigo não biofortificado. Também Liu *et al*. (2017) explicaram a importância da biofortificação de Zn ao afirmar que, para além de ser cultivado em grande parte das vezes em solos deficientes em Zn, o trigo é rico em ácido fítico, o qual se liga ao Zn, formando complexos insolúveis, diminuindo a digestibilidade e a sua absorção. Desta forma, a suplementação com Zn, isolada ou combinada com outros elementos, são uma das soluções que permite o combate a sua deficiência, principalmente em situações de dietas com baixas quantidades de produtos de origem animal, que se destacam por serem fontes ricas em Zn, ou produtos com grandes quantidades de ácido fítico (Borges *et al.*, 2016).

3.2.Selénio (Se)

O Se é considerado um metaloide com o número atómico 34. Pertence ao 16º grupo da tabela periódica e as suas propriedades físico-químicas estão intimamente aliadas com o enxofre e o telúrio (Kaur *et al*., 2016; Brasted, 2018). O Se foi descoberto em 1817 por Berzelius e ficou conhecido como um elemento essencial para animais, incluindo os seres humanos. Em 1957, reconheceu-se a sua essencialidade nutricional, após estudos sobre a fisiologia hepática em ratos deficientes em vitamina E (Zeng, 2009).

Apesar da sua reconhecida essencialidade em animais e humanos, nas plantas superiores ainda não existem provas concludentes de que assim seja (Kaur *et al.,* 2016). Existem, contudo, relatos de efeitos benéficos de Se no crescimento de plantas híper acumuladoras e, em baixas concentrações, nas plantas não acumuladoras (Schiavon *et al.*, 2013).

Os cereais podem ser uma das fontes mais importantes de Se para alimentação humana. A concentração de Se nesta cultura, sendo plantas não acumuladoras, é normalmente inferior a 0,1-1 $\mu g\ g^{-1}$. Em solos com défice de Se os níveis podem ser inferiores a 0,02 $\mu g\ g^{-1}$, enquanto em regiões seleníferas podem chegar até cerca de 30 $\mu g\ g^{-1}$ (Cubadda *et al.,* 2010).

3.2.1. Comportamento nos solos

A concentração de Se no solo depende da geologia e das condições ambientais específicas de cada local (Zhu *et al.,* 2009). Porém, outros fatores como o pH, a textura do solo, o teor de matéria orgânica, o potencial de oxirredução e a presença de iões competitivos influenciam essas concentrações (Cubadda *et al.,* 2010). Também as deposições atmosféricas resultantes de altas atividades vulcânicas, a queima de vegetação e as atividades antropogénicas, como a industrialização e aplicações via fertilizantes, podem promover o aumento da concentração em Se no solo (Souza, 2013).

O Se pode estar presente no solo na forma de selénio elementar (Se^0), selenito (SeO_3^{2-}), selenato (SeO_4^{2-}) ou seleneto (Se^{2-}). Em condições naturais, as principais formas são o selenato e o selenito. Quando comparado com o selenato, o selenito é adsorvido com uma maior afinidade na superfície das partículas argilo-húmicas do solo, nomeadamente em solos ricos em matéria orgânica, óxidos de Fe e baixo pH. O selenato é mais solúvel, móvel e facilmente adsorvido pelas plantas (Broadley *et al*., 2006; Souza, 2013; White, 2015).

No solo, os teores deste elemento são baixos, variando entre 0,01 e 2,0 mg kg^{-1}. No entanto, solos seleníferos podem atingir concentrações acima de 1200 mg kg^{-1} (White, 2015). Em geral, os solos que contenham concentrações menores que 0,6 mg kg^{-1} produzem

normalmente culturas com insuficiência de Se (Gupta e Gupta, 2000), ou seja, a concentração de Se no tecido das plantas está diretamente relacionado com a disponibilidade deste no solo (White, 2015).

3.2.2. Comportamento nas plantas

As concentrações de Se em alimentos vegetais, como o arroz (*Oryza sativa*) e o trigo (*Triticum aestivum*), podem variar significativamente entre países e regiões. Desta forma, para evitar a deficiência em Se ou a sua toxicidade é importante monitorizar e otimizar as concentrações de Se nas culturas (Zhu *et al*., 2009).

O limiar de concentração tóxica de Se para plantas depende, entre outros fatores, das espécies e também da forma como o Se é fornecido (Kápolna *et al*., 2009). A maioria das plantas que contêm baixas quantidades de Se, aproximadamente 1 mg kg^{-1} ou menos, são designadas por "não acumuladoras". Em contrapartida, existem plantas que, encontrando-se em solos seleníferos, acumulam e toleram grandes quantidades de Se (Läuchli, 1993).

Tanto quanto se sabe, o Se, sendo facilmente absorvido pelas plantas na forma de selenato através dos transportadores de sulfato, não possui uma função fisiológica conhecida. Nos processos de absorção radicular, o Se e o enxofre (S) entram através dos mesmos canais iónicos, pelo que a absorção de Se é geralmente limitada por níveis elevados de S (Kaur *et al.,* 2016). Certos autores, como Cubadda *et al.* (2010) e White (2015), afirmaram que o selenito é absorvido de forma passiva, com o envolvimento de transportadores de fosfato nas membranas celulares. O selenito é rapidamente assimilado em formas orgânicas que acabam por ficar retidas nas raízes, enquanto o selenato não é facilmente convertido em compostos orgânicos e é muito móvel no xilema (Cubadda *et al.,* 2010).

As plantas respondem de uma forma diferente à fertilização de Se, consoante se trate de selenito ou selenato. Para grande parte das culturas, o selenato apresenta-se menos tóxico do que o selenito. Em estudos realizados com selenato de sódio em trigo verificou-se que concentrações superiores a 2,6 mg kg^{-1} tinham efeito tóxico, resultando na redução de aproximadamente 10% do crescimento, quando comparadas com uma dose controlo de 2,0 mg kg^{-1} (Souza, 2013). Entretanto, Ducsay e Ložek (2006) afirmaram que uma dose de 10 g ha^{-1} é suficiente para aumentar as concentrações de Se para teores satisfatórios na cultura do trigo.

3.2.3. Importância do Selénio na saúde humana

Segundo White e Broadley (2005), cerca de 15% da população mundial é deficiente em Se. Este elemento forma facilmente a selenocisteína, sendo esta um componente essencial das selenoproteínas (Rayman, 2000), as quais estão associadas a funções antioxidantes, a processos de transcrição do mRNA, entre outras funções bioquímicas. Desta forma, constata-se que o Se seja importante para a saúde e que a deficiência deste em humanos tenha sido associada a uma infinidade de distúrbios fisiológicos (Broadley *et al*., 2006). Na verdade, a baixa ingestão de Se pode causar uma série de doenças, incluindo doenças cardíacas, redução da fertilidade masculina, enfraquecimento do sistema imunológico, maior suscetibilidade a infeções e cancro. Acredita-se qua a deficiência de Se afete cerca de 800 milhões de pessoas em todo o mundo (Malagoli *et al.*, 2015). Normalmente, essas doenças são encontradas em áreas onde as concentrações desse elemento no solo são baixas (Broadley *et al*., 2006; Navarro-Alarcon e Cabrera-Vique, 2008). Por outro lado, apesar dos limites máximos de Se já terem sido estabelecidos, ainda existe enorme controvérsia sobre as concentrações de Se que são consideradas adequadas. Isto ocorre na medida em que a concentração de Se depende da espécie animal, tempo de exposição, estado fisiológico e interação com outros nutrientes minerais. Como consequência de uma toxicidade acentuada, o sintoma mais frequente nos seres humanos é o aparecimento de selenose, caracterizadas por perda de cabelo, alterações nas unhas e fragilidade e funcionamento anormal do sistema nervoso (Navarro-Alarcon e Cabrera-Vique, 2008).

Devido ao pequeno intervalo existente entre a concentração que provoca a deficiência em Se e a sua toxicidade, e uma vez que as plantas podem acumular enormes quantidades de Se, se este estiver numa forma solúvel no solo, pode ocorrer a intoxicação de gado e outros animais que pastoreiam terras com elevadas concentrações. A toxicidade humana é rara e apenas foi relatada em áreas seleníferas, por exemplo, no distrito de Enshi, na China, onde a população depende fortemente dos produtos locais para a sua alimentação (Cubadda *et al*., 2010).

Devido à sua importância e essencialidade para humanos, as aplicações de Se, visando a biofortificação agronómica de plantas, têm sido amplamente estudadas e divulgadas na literatura nos últimos anos (Souza, 2013).

CAPÍTULO IV

4. Material e métodos

4.1.Material vegetal

Na realização deste trabalho foram utilizadas sementes de trigo mole, *Triticum aestivum* L. em Thell, da cultivar "Jordão". Estas foram gentilmente cedidas pelo Professor José Coutinho do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, polo de Elvas.

4.2. Caracterização dos ensaios

4.2.1. Localização e caracterização do solo

O ensaio de campo decorreu, de Outubro de 2016 a Junho de 2017, no *Campus* da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real (41º17'7.03"N; 7º44'23.75"W; 466 m) (Figura 12). Foram recolhidas duas amostras de solo (A e B) de forma aleatória entre 0-20 cm de profundidade para análise e respetiva fertilização (Quadro 1). Os fertilizantes foram incorporados nas doses recomendadas através de mobilização do solo com trator equipado com grade de discos. Seguidamente, fez-se uma aplicação de herbicida pré-sementeira específico para a cultura de cereais, Stomp Aqua (455 g/l pendimetalina, BASF), de modo a controlar a emergência inicial de infestantes.

Figura 12: *Campus* da UTAD (Google Earth Pro, 2018) com ampliação da respetiva parcela usada no estudo.

Quadro 1: Resumo das análises de solo relativas à parcela em estudo.

Amostra	pH (H_2O)	pH (KCl)	% M.O.	mg P_2O_5/Kg	mg K_2O/Kg
A	4,3	3,4	2,14	60	282
B	4,3	3,4	1,95	99	282

4.2.2. Dispositivo experimental

Os tratamentos foram dispostos de forma completamente casualizada e em triplicado. Os grãos de trigo foram semeados em talhões de 2 m^2, dispostos em 6 linhas pareadas, com uma densidade de 300 plantas m^{-2}. As linhas de sementeira foram abertas manualmente e as sementes colocadas de modo uniforme ao longo da linha no dia 18 de novembro de 2016. No dia anterior à sementeira (17 de novembro), a mesma quantidade de grãos de trigo, foi colocada em agitação por 12 horas, embebida em solução de Se (2,5 e 25 mM) e de Zn (0,012 e 0,024 mM). Estas soluções obtiveram-se pela diluição de selenato de sódio (Na_2SeO_4) e de sulfato de zinco ($ZnSO_4$) em água destilada. Após serem escorridas e lavadas em água destilada, as sementes foram colocadas a secar. Sempre que necessário procedeu-se a mondas de forma a controlar o desenvolvimento excessivo de infestantes durante as fases iniciais do desenvolvimento do trigo (Figura 13). Realizou-se uma adubação azotada na dose de 80 kg de N ha^{-1} em dois períodos, sendo aplicado um terço à sementeira e o restante na fase inicial de encanamento.

Figura 13: Remoção manual de infestantes entre os talhões de trigo.

4.3. Métodos

4.3.1. Expressão vegetativa

Em cada talhão, das 6 linhas de plantas, sistematizaram-se duas linhas para a avaliação da produção após a maturação do grão, uma para avaliações de vários parâmetros fisiológicos e três para a colheita de plantas destinadas à avaliação de parâmetros morfológicos e respetiva biomassa. Estes parâmetros foram avaliados ao final do encanamento, após a floração, e após a maturação do grão. Em cada uma destas fases foram colhidas plantas, localizadas na mesma

linha e lado a lado, num comprimento de cerca de 40 cm de linha. Nestas colheitas, as plantas foram arrancadas com raiz e transportadas para o laboratório. Procedeu-se a remoção do solo aderido às raízes e avaliaram-se vários parâmetros, entre os quais: tamanho e/ou número de plantas, folhas, colmos e espigas. Para obter a biomassa produzida, as amostras de folhas, colmos e espigas foram colocadas a secar numa estufa a 60ºC por um período de pelo menos 120 horas. Contudo, no presente trabalho apenas se avaliaram os dados recolhidos durante a fase de floração.

4.3.2. Análise de parâmetros fisiológicos

4.3.2.1. Índice de área foliar

Foi estimado o índice de área foliar recorrendo a um ceptómetro (AccuPAR PAR/LAI, Modelo LP-80, Decagon Devices, Inc., USA) (Figura 14). Os sensores deste equipamento permitem determinar a radiação fotossinteticamente ativa e, através desta, estimar o LAI (índice de área foliar). Sendo um equipamento muito prático e permitir medições rápidas e não destrutivas, foram realizadas várias medições durante o período em que as plantas de trigo tinham o crescimento mais acelerado, ou seja, durante o encanamento. As medições foram realizadas em dias de céu limpo, sem efeito de sombreamento, e no período do meio-dia solar, entre as 12:30 e as 14:00h. Realizaram-se 6 medições em locais aleatórios por cada talhão.

Figura 14: Medição do índice de área foliar com recurso a um ceptómetro (AccuPAR PAR/LAI, Modelo LP-80, Decagon Devices, Inc., USA).

4.3.2.2. Estimativa dos teores em clorofila

O teor em clorofila expressa o estado fisiológico das plantas ao longo do ciclo vegetativo e é relativamente sensível aos fatores ambientais e culturais, daí a importância da avaliação deste parâmetro (Shibghatallah *et al*., 2013). Os valores obtidos pelo dispositivo encontram-se intimamente relacionadas com a concentração de clorofila e de azoto presente nas folhas numa grande diversidade de espécies (Daughtry *et al.,* 2000), o que nos permite estimar o teor de N em tempo real. A sua determinação foi executada com recurso a um medidor portátil CCM-300 (Hudson, NH 03051, USA) (Figura 15). Foram realizadas 3 medições por talhão no final da fase de encanamento.

Figura 15: Avaliação dos pigmentos clorofilinos com recurso a um medidor CCM-300 (Hudson, NH 03051, USA).

4.3.2.3. Trocas gasosas

A medição das trocas gasosas das folhas foi realizada com um analisador de gás por radiação infravermelha (IRGA) (LCpro+, ADC, Hoddesdon, England), funcionando em modo diferencial e em circuito aberto (Figura 16). As medições foram realizadas no final da fase de encanamento em folhas terminais bem desenvolvidas e em bom estado fitossanitário expostas a condições de luz saturante (PPFD ≥ 1000 μmol. m^{-2}. s^{-1}). Os cálculos da taxa de fotossíntese aparente (A; μmol m^{-2} s^{-1}), da taxa de transpiração (E; mmol m^{-2} s^{-1}) e de condutância estomática para o vapor de água ($g_{s;}$ mmol m^{-2} s^{-1}) foram realizados de acordo com von Caemmerer e Farquhar (1981).

As unidades apresentadas são as propostas por Cowan (1978), sendo expressas por unidade de área foliar projetada (área de apenas uma das superfícies foliares). Procedeu-se ainda ao cálculo da razão A/g_s para se obter uma estimativa da eficiência intrínseca do uso da água.

Figura 16: Medição das trocas gasosas com recurso a um analisador de gás por radiação infravermelha (IRGA) (LCpro+, ADC, Hoddesdon, England).

4.3.2.4. Fluorescência da clorofila *a*

As medições de fluorescência da clorofila *a* foram realizadas *in vivo*, no final da fase de encanamento, em folhas bem desenvolvidas e bom estado fitossanitário, usando um fluorímetro portátil (MINI-PAM-II, Heinz Walz, Effeeltrich, Germany), de acordo com os procedimentos e cálculos descritos por Bilger e Schreiber (1986), Öquist e Wass (1988) e Genty *et al*., (1989). Sucintamente, após adaptação prévia das folhas ao escuro durante um período de aproximadamente 30 minutos, foram avaliadas as seguintes variáveis: fluorescência basal (F_0), fluorescência máxima (F_m), fluorescência variável ($F_v=F_m-F_0$) e eficiência fotoquímica máxima de PSII (F_v/F_m). Depois deste grupo de medições, as folhas foram aclimatadas à luz natural para determinação do comportamento fotoquímico das folhas nestas condições de iluminação, determinando-se as seguintes variáveis: fluorescência em *steady state* antes do pulso de luz saturante (F_s), fluorescência máxima do tecido vegetal iluminado com pulso de luz saturante (F'_m), fluorescência basal (F'_0), coeficientes de extinção fotoquímica ($qP=(F'_m-F_s)/(F'_m-F'_0)$) e não fotoquímica ($NPQ=(F_m-F'_m)/F'_m$), eficiência fotoquímica do PSII à luz (F'_v/F'_m, também

designada por parâmetro de Genty), eficiência fotoquímica efetiva do PSII ($\Phi_{PSII}=\Delta F/F'_m=(F'_m-F_s)/F'_m$) e taxa de transporte de eletrões ($ETR=(\Delta F/F'_m).PPFD.0,5.0,84$).

4.4. Análise estatística

Todos os dados recolhidos foram tratados estatisticamente recorrendo ao software JMP v7.1 (SAS, 2007). Para todos os parâmetros analisados realizou-se uma ANOVA com teste de significância de Tukey ($P<0,05$) entre os diferentes tratamentos. Em cada tratamento fizeram-se 22 determinações para os parâmetros morfológicos e pelo menos 8 determinações para os parâmetros fisiológicos.

CAPÍTULO V

5. Resultados

5.1.Expressão vegetativa

Os resultados que a seguir se apresentam expressam o efeito do selénio e do zinco no crescimento de plantas de trigo da cultivar 'Jordão' em condições de campo 161 dias após a sementeira (DAS), no momento da floração. De acordo com os resultados apresentados no Quadro 2, constata-se que o efeito do Se a 2,5 e 25 mM resultou em aumentos na altura das plantas de 14 e 9%, respetivamente. Já no que respeita ao efeito do Zn, as concentrações utilizadas contribuíram para uma redução significativa do tamanho das plantas, sendo este mais evidente na concentração 0,024 mM (Zn ++). À semelhança do que aconteceu no crescimento, ocorreu uma tendência geral para as concentrações de Se promoverem a formação de novos caules, folhas e espigas, apesar de só assumir diferença significativa no número de folhas no tratamento 25mM. Em oposição, as diferentes doses de Zn apresentaram tendências distintas. No tratamento com 0,012 mM (Zn +), verificou-se redução da altura e do número de caules e folhas, enquanto na concentração mais elevada de Zn ocorreu um aumento do número de caules, não se alterando o número de folhas e a altura das plantas relativamente às plantas do tratamento controlo. Em qualquer caso, as plantas tratadas com 0,024 mM apresentaram maior número de caules e de folhas que as plantas tratadas com a concentração mais baixa de Zn. Por outro lado, não se verificou efeito significativo da aplicação de Zn no número de espigas, apesar da tendência para aumento, particularmente na concentração mais elevada.

Quadro 2: Altura (cm) e número de caules, folhas e espigas por planta em resposta a diferentes concentrações de selénio (Se +: 2,5 mM e Se ++: 25 mM) e zinco (Zn +: 0,012 mM e Zn ++: 0,024 mM). Resultados relativos à colheita 161 DAS, no momento em que ocorre a fase de floração. Os valores expressam a média ± erro padrão (n=22).

		Altura	Caules	Folhas	Espigas
Controlo		70,8 ± 1,12 ^{b}	3,67 ± 0,11 ^{bc}	15,8 ± 0,50 ^{b}	2,54 ± 0,11 ^{a}
Se	+	80,4 ± 0,84 ^{a}	4,14 ± 0,21 ^{ab}	18,2 ± 0,82 ^{ab}	2,76 ± 0,13 ^{a}
	++	77,2 ± 1,13 ^{a}	4,25 ± 0,24 ^{ab}	18,8 ± 0,92 ^{a}	2,47 ± 0,13 ^{a}
Zn	+	64,6 ± 1,21 ^{c}	3,18 ± 0,18 ^{c}	13,3 ± 0,69 ^{c}	2,77 ± 0,15 ^{a}
	++	60,7 ± 1,46 ^{c}	4,73 ± 0,30 ^{a}	16,5 ± 1,03 ^{ab}	2,95 ± 0,18 ^{a}
P-Value		<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,1282

**Em cada coluna, médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, Tukey a 5% de probabilidade (P<0,05).*

Relativamente à matéria seca acumulada (Quadro 3), nas plantas tratadas com Se determinaram-se valores mais elevados, apesar de só apresentarem carácter significativo no

tratamento 2,5 mM (Se +) os valores de biomassa total (31%), em consequência do aumento do peso seco dos caules (23%) e, sobretudo, das espigas (33%). Por outro lado, as aplicações de Zn não revelaram efeitos significativos na biomassa total e nos seus diferentes componentes, apesar da tendência geral ser de redução. No entanto, verificou-se uma excepção áquele comportamento, atendendo a que as plantas do tratamento 0,024 mM (Zn ++) apresentaram o maior peso seco das folhas entre todos os tratamentos testados.

Quadro 3: Peso seco total (mg) e peso seco dos diferentes órgãos da planta (mg) em resposta a diferentes concentrações se selénio (Se +: 2,5 mM e Se ++: 25 mM) e zinco (Zn +: 0,012 mM e Zn ++: 0,024 mM). Resultados relativos à colheita 161 DAS, no momento em que ocorre a fase de floração. Os valores expressam a média ± erro padrão (n=22).

Tratamentos		Peso seco			
		Total	Caules	Folhas	Espigas
Controlo		5369 ± 248 bc	2885 ± 135 b	892 ± 44 b	983 ± 50 b
Se	+	7028 ± 327 a	3540 ± 173 a	1064 ± 61 b	1303 ± 68 a
	++	6148 ± 438 ab	3061 ± 212 ab	1051 ± 65 b	1108 ± 86 ab
Zn	+	4495 ± 192 c	2638 ± 125 b	921 ± 49 b	935 ± 44 b
	++	4937 ± 339 bc	2575 ± 183 b	1390 ± 110 a	972 ± 69 b
P-Value		<0,0001	0,0012	<0,0001	0,0006

**Em cada coluna, médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, Tukey a 5% de probabilidade (P<0,05).*

5.2.Índice de área foliar

Os valores que a seguir se apresentam dizem respeito ao índice de área foliar (LAI) avaliado aos 119, 122, 131 e 145 DAS, momento em que ocorreu o alongamento dos caules. Esta fase de desenvolvimento, designada por encanamento, é caracterizada como um dos períodos mais críticos do desenvolvimento das plantas. Pela análise do Quadro 4, verifica-se que os tratamentos com Se influenciaram a evolução do LAI. Aos 119 DAS, as plantas provenientes dos tratamentos com Se apresentavam LAI superior, com aumentos significativos de 27 e 36% nas concentrações de 2,5 e 25 mM, respetivamente. De notar que os aumentos de LAI com a aplicação de Se se mantiveram aos 122 e 131 DAS, apesar de na última data só apresentar diferença significativa na concentração mais elevada. Por outro lado, as parcelas com Zn não apresentaram resultados tão favoráveis, observando-se um efeito nulo no tratamento de 0,012 mM (Zn +) e uma redução na ordem dos 30% no tratamento de 0,024 mM (Zn ++). No que diz respeito aos valores registados 122 DAS, quando comparado com a data anterior, constatou-se que as plantas resultantes do tratamento com 0,024 mM de Zn já não apresentavam redução de LAI, comportamento que se manteve nas datas de amostragem posteriores. Por fim,

a última avaliação, realizada 145 DAS, correspondente ao fim da fase de encanamento, revelou que as plantas de todos os tratamentos não diferiam significativamente das plantas controlo (P=0,5929).

Quadro 4: Índice de área foliar (LAI; m^2 m^{-2}) em resposta a diferentes concentrações de selénio (Se +: 2,5 mM e Se ++: 25 mM) e zinco (Zn +: 0,012 mM e Zn ++: 0,024 mM). Resultados relativos às medições realizadas 119, 122, 131 e 145 DAS, momento em que ocorre a fase de encanamento. Os valores expressam a média ± erro padrão (n=12).

Tratamentos		LAI			
		119 DAS	122 DAS	131 DAS	145 DAS
Controlo		1,45 ± 0,06 c	1,60 ± 0,08 c	1,53 ± 0,07 bc	2,65 ± 0,10 a
Se	+	1,84 ± 0,11 ab	2,00 ± 0,09 ab	1,79 ± 0,10 ab	2,65 ± 0,13 a
	++	1,97 ± 0,08 a	2,15 ± 0,08 a	1,99 ± 0,14 a	2,77 ± 0,14 a
Zn	+	1,48 ± 0,12 bc	1,66 ± 0,10 bc	1,62 ± 0,11 abc	2,68 ± 0,19 a
	++	1,01 ± 0,07 d	1,54 ± 0,09 c	1,26 ± 0,06 c	2,40 ± 0,20 a
P-Value		<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,5929

**Em cada coluna, médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, Tukey a 5% de probabilidade (P<0,05).*

Não obstante a ausência de diferenças de LAI na última data, é importante realçar que o valor médio ao longo do período analisado (fase de encanamento) diferiu significativamente entre os tratamentos (Quadro 5).

Quadro 5: Índice de área foliar (LAI; m^2 m^{-2}) em resposta a diferentes concentrações de selénio (Se +: 2,5 mM e Se ++: 25 mM) e zinco (Zn +: 0,012 mM e Zn ++: 0,024 mM). Resultados relativos à média do período 119 a 145 DAS, momento em que ocorre a fase de encanamento. Os valores expressam a média ± erro padrão (n=12).

Tratamentos		LAI
		119 DAS a 145 DAS
Controlo		1,81 ± 0,04 c
Se	+	2,07 ± 0,06 ab
	++	2,22 ± 0,06 a
Zn	+	1,86 ± 0,06 bc
	++	1,55 ± 0,06 d
P-Value		<0,0001

**Em cada coluna, médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, Tukey a 5% de probabilidade (P<0,05).*

Como se constata, verificou-se que as plantas tratadas com 25 mM de Se (Se ++) foram as que mais beneficiaram, aumentando o valor médio de LAI em cerca de 23%, enquanto que as plantas tratadas com 2,5 mM Se beneficiaram de um aumento médio na ordem dos 14%. Relativamente ao efeito do Zn no LAI, na menor concentração testada de Zn (Zn +) os

resultados não foram significativamente diferentes em relação às plantas controlo, ao contrário do que se observou na concentração de 0,024 mM (Zn ++), em que o Zn contribuiu para uma redução de cerca de 14% do LAI.

5.3.Teores de clorofila

Os resultados que a seguir se apresentam (Quadro 6) expressam o efeito do Se e do Zn no que diz respeito aos teores em clorofila total registados 145 DAS, após o período de encanamento. No que respeita aos tratamentos com Se, ambas as concentrações testadas contribuíram para um ligeiro aumento de clorofila, sendo registado aumentos de aproximadamente 3% para plantas testadas com 2,5 mM (Se +) e 8% para plantas testadas com 25 mM (Se ++). Contudo, apenas na maior concentração (Se ++) é que se verificou um efeito significativo relativamente às plantas controlo. Quanto ao Zn, não se verificaram diferenças significativas em relação às plantas controlo, constatando-se a tendência para um ligeiro decréscimo de 7% nas duas concentrações testadas.

Quadro 6: Teor de clorofila (mg m^{-2}) em resposta a diferentes concentrações de selénio (Se +: 2,5 mM e Se ++: 25 mM) e zinco (Zn +: 0,012 e Zn ++: 0,024 mM). Resultados relativos às medições realizadas 145 DAS, momento pós encanamento. Os valores expressam a média ± erro padrão (n=12).

Tratamentos		Clorofila (mg m^{-2})
Controlo		820 ± 15,9 bc
Se	+	849 ± 17,4 ab
	++	888 ± 16,5 a
Zn	+	764 ± 20,0 c
	++	763 ± 18,7 c
P-Value		<0,0001

**Em cada coluna, médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, Tukey a 5% de probabilidade (P<0,05).*

5.4.Trocas gasosas

Pela análise dos valores do quadro 7, relativos às determinações efetuadas 145 DAS, momento pós encanamento, constata-se que ambos os micronutrientes apresentaram efeitos significativos (P<0,05) na maioria dos parâmetros das trocas gasosas das folhas. Os tratamentos com Se apresentaram ligeiros aumentos de A e E, não tendo, contudo, diferido significativamente da amostra controlo. Já no que diz respeito a g_s, observaram-se diferenças significativas, com um aumento de 94% nas plantas testadas com 2,5 mM (Se +) e 89% nas

plantas testadas com 25 mM (Se ++). Da mesma forma, observaram-se efeitos significativos nos restantes parâmetros, com aumento de C_i/C_a (27%) e redução de A/g_s (42%) para ambas as concentrações. Quanto ao Zn, nas duas concentrações testadas constataram-se reduções significativas de A (28 e 38%) e de E (22 e 30%), relativamente às plantas controlo, sendo os maiores decréscimos nas plantas testadas com as maiores concentrações (Zn ++). Quanto ao g_s, registou-se um decréscimo próximo de 40% para ambas as concentrações. Nos restantes parâmetros, constatou-se que os diferentes tratamentos de Zn não diferiram estatisticamente do tratamento controlo.

Quadro 7: Taxa de assimilação líquida de CO_2 (A), condutância estomática (g_s), eficiência intrínseca do uso da água (A/g_s), razão entre as concentrações de CO_2 nos espaços intercelulares e na atmosfera (C_i/C_a) e taxa de transpiração (E) em resposta a diferentes concentrações de selénio (Se +: 2,5 mM e Se ++: 25 mM) e zinco (Zn +: 0,012 mM e Zn ++: 0,024 mM). Resultados relativos às medições realizadas 145 DAS, momento pós encanamento. Os resultados expressam a média ± erro padrão (n=8).

Tratamentos		A ($\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$)	g_s ($mmol\ m^{-2}\ s^{-1}$)	A/g_s ($\mu mol\ mol^{-1}$)
Controlo		22,9 ± 0,68 ^{a}	323 ± 21,0 ^{b}	76,6 ± 3,98 ^{a}
Se	+	26,8 ± 0,86 ^{a}	627 ± 58,0 ^{a}	44,5 ± 2,95 ^{b}
	++	25,2 ± 1,21 ^{a}	613 ± 74,7 ^{a}	44,9 ± 3,99 ^{b}
Zn	+	16,6 ± 1,20 ^{b}	194 ± 14,9 ^{c}	86,0 ± 2,73 ^{a}
	++	14,1 ± 1,75 ^{b}	201 ± 34,9 ^{c}	80,5 ± 3,94 ^{a}
P-Value		<0,0001	<0,0001	<0,0001

Tratamentos		C_i/C_a	E ($mmol\ m^{-2}\ s^{-1}$)
Controlo		0,550 ± 0,021 ^{b}	7,86 ± 0,24 ^{a}
Se	+	0,701 ± 0,009 ^{a}	8,24 ± 0,14 ^{a}
	++	0,700 ± 0,011 ^{a}	7,76 ± 0,32 ^{ab}
Zn	+	0,519 ± 0,015 ^{b}	6,12 ± 0,41 ^{bc}
	++	0,554 ± 0,016 ^{b}	5,53 ± 0,54 ^{c}
P-Value		<0,0001	<0,0001

**Em cada coluna, médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, Tukey a 5% de probabilidade (P<0,05).*

5.5. Fluorescência da clorofila *a*

Os valores que se apresentam no Quadro 8 são relativos às medições da fluorescência da clorofila *a* realizadas no mesmo dia e período do dia das medições das trocas gasosas, 145 DAS, momento pós encanamento. De uma forma geral foi possível constatar que os efeitos do Se e do Zn não tiveram influência significativa nos diferentes parâmetros de fluorescência da

clorofila *a*, pelo que não se verificou qualquer influência de ambos os micronutrientes nas reações fotoquímicas da fotossíntese.

Quadro 8: Eficiência quântica máxima (F_v/F_m), eficiência fotoquímica do PSII à luz (F'_v/F'_m), rendimento efetivo do PSII (Φ_{PSII}), taxa de transporte de eletrões (ETR, μmol $e^- m^{-2} s^{-1}$), coeficiente de extinção fotoquímica (qP) e coeficiente de extinção não fotoquímica (NPQ) em resposta a diferentes concentrações de selénio (Se +: 2,5 mM e Se ++: 25 mM) e zinco (Zn +: 0,012 mM e Zn ++: 0,024 mM). Resultados relativos às medições realizadas 145 DAS, momento pós encanamento. Os valores expressam a média ± erro padrão (n=8).

Tratamentos		F_v/F_m	F'_v/F'_m	Φ_{PSII}
Controlo		0,79 ± 0,004 ^{a}	0,66 ± 0,010 ^{abc}	0,45 ± 0,006 ^{abc}
Se	+	0,78 ± 0,005 ^{a}	0,61 ± 0,016 ^{c}	0,42 ± 0,008 ^{c}
	++	0,78 ± 0,006 ^{a}	6,63 ± 0,013 ^{bc}	0,43 ± 0,009 ^{bc}
Zn	+	0,80 ± 0,004 ^{a}	0,70 ± 0,003 ^{a}	0,47 ± 0,003 ^{a}
	++	0,79 ± 0,006 ^{a}	0,66 ± 0,014 ^{ab}	0,46 ± 0,008 ^{ab}
P-Value		0,1711	0,0005	0,0021

		qP	ETR	NPQ
Controlo		0,688 ± 0,003 ^{a}	331 ± 4,50 ^{abc}	0,552 ± 0,036 ^{ab}
Se	+	0,695 ± 0,005 ^{a}	312 ± 6,10 ^{c}	0,688 ± 0,050 ^{a}
	++	0,694 ± 0,002 ^{a}	319 ± 6,27 ^{bc}	0,594 ± 0,045 ^{ab}
Zn	+	0,673 ± 0,003 ^{a}	344 ± 1,93 ^{a}	0,381 ± 0,023 ^{b}
	++	0,691 ± 0,010 ^{a}	335 ± 5,82 ^{ab}	0,556 ± 0,068 ^{ab}
P-Value		0,0801	0,0021	0,003

**Em cada coluna, médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si, Tukey a 5% de probabilidade (P<0,05).*

CAPÍTULO VI

6. Discussão

A discussão dos resultados que a seguir se apresenta analisa de forma independente o efeito específico de cada um dos micronutrientes estudados no crescimento e desenvolvimento de plantas de trigo, uma vez que foi desta forma que os ensaios de campo foram delineados.

6.1.Selénio

Os resultados recolhidos neste estudo confirmam que a preparação de sementes com Se influenciam o comportamento fisiológico das plantas de trigo. De uma maneira geral, as plantas germinadas a partir de sementes tratadas com ambas as concentrações de Se apresentaram aumentos de altura e de biomassa acumulada (Quadros 2 e 3), destacando-se de forma especial as plantas resultantes de tratamento com menores concentrações (Se +). Em concordância, Nawas *et al*. (2013) mostraram que plantas de trigo sob stresse hídrico, tratadas com concentrações de Se mais baixas, entre 25 e 100 μM, apresentaram aumentos de matéria seca. Estes autores explicaram ainda que a melhoria resultou do papel benéfico que o Se apresenta no combate à seca, devido ao efeito positivo que tem nas relações hídricas das plantas e na ativação de hormonas que favorecem a expansão celular, das quais se destacam as auxinas. Também Khaliq *et al.* (2015), num estudo efetuado em arroz sujeito a diferentes concentrações de Se, demonstraram que, de sementes preparadas em soluções entre 30 e 60 μM, resultaram plantas com maiores crescimentos. Embora as condições de crescimento e a espécie em estudo sejam diferentes das que foram usadas no nosso estudo, a concentração de 2,5 mM de Se é a que mais se aproxima dos melhores resultados daqueles autores. Contudo, a atestar pelos resultados obtidos na maior concentração (25 mM), em que o crescimento das plantas não foi prejudicado em relação às plantas controlo, pode-se inferir que o trigo responde positivamente a uma gama mais alargada de concentrações de selénio. Ainda no que diz respeito à expressão vegetativa, constatou-se que os ensaios realizados com Se promoveram um ligeiro aumento na formação de novas plantas (Quadro 2). Estes resultados vão de encontro aos obtidos por Nawaz *et al.* (2017) que concluíram que o Se influencia o afilhamento em plantas de trigo. Também Yao *et al*. (2009) demonstraram que o Se promoveu o desenvolvimento de raízes mais saudáveis e vigorosas nas fases iniciais, aumentando significativamente a sua atividade sob condições adversas. Segundo Hussain *et al*. (2016), um dos processos fundamentais que influenciam diretamente a germinação, o crescimento inicial e o posterior vigor das plantas é o metabolismo do amido. Em estudos efetuados com plantas de arroz, o revestimento de sementes com Se aumentou a atividade da α-amilase, que hidrolisa o amido em açúcares solúveis,

favorecendo a respiração e, consequentemente, um melhor crescimento. Provavelmente, nos ensaios realizados no presente estudo, o Se apresentou o mesmo efeito na atividade da α-amilase, refletindo dessa forma, o papel vital no estabelecimento de novas plântulas de trigo. Para além disso, a formação de novos caules termina normalmente antes da fase de encanamento devido à elevada competição por recursos (Coco, 2013) e, em situações mais rigorosas, há inclusive, a morte de alguns "afilhos" numa ordem inversa ao seu aparecimento (Monteiro, 2009). Nesta fase (encanamento), ocorre em simultâneo o desenvolvimento de outros órgãos, caracterizados como sumidouros adicionais e a competição por fotoassimilados eleva-se, fazendo com que, por vezes, o crescimento e o rendimento final sejam comprometidos (Coco, 2013).

Uma vez que grande parte da matéria orgânica das plantas é produzida nas folhas, um dos indicadores mais importantes de crescimento intimamente relacionado com o desenvolvimento e produtividade é o tamanho da superfície assimilante (Kashin e Shubina, 2011). A avaliação da superfície foliar (Quadros 4 e 5), realizada ao longo do encanamento, permitiu verificar um certo paralelismo com os parâmetros acima referidos, atendendo a que se constatou que plantas com maior LAI favorecem o crescimento e a acumulação de matéria seca. Teimouri *et al.* (2014) apresentaram resultados similares, justificando que o Se influencia o crescimento foliar, promovendo a atividade fotossintética, geradora de fotoassimilados para o desenvolvimento de mais massa foliar. De facto, verificou-se no presente estudo que, durante o encanamento, as plantas testadas com ambas as concentrações de Se expressaram maiores valores de LAI, o que pode justificar, em grande parte, o maior desenvolvimento da estrutura vegetativa e produção de fotoassimilados para suprir as necessidades dos novos sumidouros existentes.

No que se refere às concentrações de clorofila (Quadro 6), as medições efetuadas permitiram constatar que as plantas controlo relevaram menores concentrações de pigmentos fotossintéticos quando comparadas com as plantas resultantes de sementes preparadas com Se. Segundo Nawaz *et al.* (2016), os menores valores de pigmentos fotossintéticos observados podem provavelmente estar associados à desintegração das moléculas de clorofila devido à produção excessiva de espécies reativas de oxigénio (ROS). Por outro lado, os maiores valores registados em plantas resultantes de sementes testadas com Se estão de acordo com os obtidos por Habili (2013), que constatou o efeito benéfico do Se na atividade de enzimas antioxidantes, designadamente na superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD) e ascorbato peroxidase (APX). Entre outros efeitos, estas enzimas ajudam a prevenir a

peroxidação lipídica, aumentando a eficiência na atividade fotossintética sob a influência de vários stresses abióticos (Nawaz *et al.*, 2016). Khan *et al.* (2015) também constataram que o Se promovia maior integridade dos cloroplastos, minimizando a ocorrência de danos oxidativos que aí possam ocorrer. Corroborando igualmente estes efeitos, Ahmad *et al*. (2016) afirmaram que o Se contribui para a redução de danos causados pelo stresse oxidativo induzido pela radiação ultravioleta, sendo este efeito revelado por um aumento do teor de clorofila. Uma vez que as clorofilas promovem diretamente a absorção e conversão de energia luminosa (Rivas, 2000), provavelmente as plantas resultantes de sementes testadas com Se apresentaram vantagem em utilizar a energia luminosa de forma mais eficiente. Contudo, apesar de se verificarem aumentos dos teores destes pigmentos em ambas as concentrações testadas com Se, os maiores valores foram encontrados nas plantas resultantes de sementes testadas com 25 mM.

O estado hídrico das células é determinado pelo balanço entre a perda de água no processo de transpiração e a absorção de água presente no solo. Quando a transpiração excede a absorção, o conteúdo relativo de água diminui, levando a uma redução da turgescência celular (Lawlor e Cornic, 2002). Segundo Habibi (2013), os estomas presentes nas folhas desempenham um papel importante nas trocas gasosas das plantas influenciando o seu desenvolvimento, em particular, quando expostas a condições de défice hídrico. O baixo teor de água nas folhas contribui para a redução do crescimento e da condutância estomática (g_s) (Lawlor e Cornic, 2002). A avaliaçãoparâmetros (Quadro 7) permitiu verificar que o efeito do Se influenciou significativamente as trocas gasosas, aumentando a condutância estomática (g_s) em aproximadamente 90%. Nawaz *et al.* (2015) constataram que tratamentos foliares com concentrações expressivamente mais baixas de Se (≈ 0,21 mM) favoreceram as trocas gasosas de plantas de trigo, com aumentos significativos em g_s e, consequentemente, em A e E. Da mesma forma, Balal *et al.* (2016) verificaram um efeito semelhante na cultura do pepino. Estes resultados confirmam, uma vez mais, a hipótese do papel benéfico que o Se apresenta nas relações hídricas das plantas, aumentando o conteúdo de água nas folhas. Porém, no presente estudo não se constatou a mesma consequência para a atividade fotossintética (A) e transpiração das plantas (E), onde os valores não diferiram significativamente dos obtidos nas plantas controlo, apesar da tendência variar no mesmo sentido. A ausência de efeitos significativos em A e o aumento de g_s justificam o decréscimo observado em A/g_s e está em consonância com o aumento de C_i/C_a. É de admitir que a maior concentração de C_i/C_a induzida pela aplicação de Se não esteja relacionada com limitações não estomáticas, devido à difusão do CO_2 e/ou a limitações na eficiência da carboxilação, mas seja apenas uma consequência da elevada

condutância estomática, como descrito por Lawlor e Cornic (2012). Não obstante a ausência de efeitos significativos da aplicação de Se em A, é provável que a acumulação diária de pequenas vantagens na atividade fotossintética possa ter consequências positivas na acumulação de biomassa no médio/longo-prazo.

Do ponto de vista das reações fotoquímicas da fotossíntese, a análise efetuada aos parâmetros de fluorescência de clorofila *a* (Quadro 8) revelou-se conclusiva. Os resultados obtidos permitiram constatar que os efeitos do Se não tiveram qualquer influência significativa na eficiência quântica máxima (F_v/F_m), nem em todos os outros parâmetros avaliados que, de acordo com vários autores, constituem excelentes indicadores da integridade funcional dos cloroplastos, em especial da atividade do fotossistema II (Maxwell e Johnson, 2000; Juneau *et al.*, 2005; Lichtenthaler *et al.*, 2005; Baker, 2008; Murchie e Lawson, 2013). Segundo Muechie e Lawson (2013), a avaliação da fluorescência da clorofila *a* é uma das técnicas mais usadas em fisiologia vegetal e apresenta um papel vital na compreensão dos mecanismos fundamentais da fotossíntese. Uma vez que a energia luminosa absorvida pelas moléculas de clorofila pode ser conduzida para a fotossíntese ou ser reemitida como calor ou luz (fluorescência), o rendimento da emissão de fluorescência dá-nos informações valiosas sobre a eficiência fotoquímica e dissipação de calor (Maxwell e Johnson, 2000). Teoricamente, os valores de F_v/F_m funcionam como um indicador robusto da eficiência quântica máxima do PSII. Em folhas em situações de ausência de stresse, o valor F_v/F_m é altamente consistente, com valores próximos de 0,83, admitido como valor ótimo para a fotossíntese (Björkman e Demmig, 1987). A existência de qualquer tipo de stresse que resulte em danos de inativação do PSII, frequentemente mencionados como fotoinibição, induz ao aumento do *quenching* não fotoquímico (NPQ) e uma redução de F_v/F_m (Murchie e Lawson, 2013). Para além disso, sob circunstâncias controladas, o rendimento efetivo do PSII (Φ_{PSII}) é um indicador que se relaciona intimamente com a taxa de assimilação de CO_2. Esta relação faz sentido intuitivo e funciona com precisão, uma vez que, os produtos do transporte de eletrões, ATP e NADPH, são usados diretamente no processo de assimilação de CO_2 em proporções conhecidas (Murchie e Lawson, 2013). Alguns autores, como Hajiboland *et al.* (2015) compararam, em condições de stresse hídrico, plantas sujeitas a aplicações foliares de Se com plantas de trigo desfavorecidas deste elemento. Aqueles autores verificaram que as plantas desprovidas de Se mostravam fenómenos de fotoinibição, redução no transporte de eletrões e danos no PSII. Porém, a avaliação destes parâmetros em plantas testadas com Se indicaram que estas plantas apresentavam uma maior proteção do aparelho fotossintético e, portanto, uma maior tolerância aos efeitos da seca.

6.2. Zinco

O efeito do Zn no crescimento e desenvolvimento das plantas de trigo resultou em diferenças significativas na maioria dos parâmetros avaliados. Duma forma geral, podemos verificar que ambas as concentrações de Zn testadas inibiram o crescimento das plantas em altura, mas não afetaram a matéria seca total das plantas (Quadros 2 e 3). Estes resultados mostraram concordância com vários estudos efetuados em diversas culturas. Por exemplo, Mahmood *et al.* (2007) concluíram que, em estudos laboratoriais com concentrações entre 0,001 e 0,010 mM, plantas de trigo, arroz e cevada reduziam proporcionalmente a tolerância ao Zn consoante as concentrações testadas. Aqueles autores verificaram ainda que, numa fase inicial de crescimento, concentrações de Zn a partir de 0,005 mM reduziam significativamente o comprimento das raízes das plantas e, consequentemente, o seu crescimento. Também Santos (2014) revelou, ao utilizar concentrações quatro vezes superiores às recomendadas para a cultura do cafeeiro, que elevadas concentrações de Zn contribuem para a redução destes parâmetros. Santos (2014) acrescentou que este comportamento pode estar associado a desequilíbrios nutricionais, uma vez que, a similaridade do raio iónico entre o Zn^{2+}, Fe^{2+} e Mg^{2+} pode gerar uma absorção diferenciada destes nutrientes. Assim sendo, assume-se que tais decréscimos resultaram de um suposto efeito tóxico criado pelas concentrações testadas. Contudo, apesar de uma tendência ligeira para a diminuição de matéria seca em ambas as concentrações, as plantas resultantes do tratamento com 0,024 mM (Zn ++) apresentarm um aumento de 56% no peso seco das folhas. O aumento de peso nas folhas das plantas pode ser justificado como consequência do excesso de Zn. Segundo Soares *et al.* (2001), o efeito do Zn interfere no metabolismo dos hidratos de carbono, limitando o transporte de fotoassimilados. Da mesma forma, Santos (2014) afirma que a acumulação de hidratos de carbono nas folhas está diretamente relacionada com alterações no processo fotossintético. A redução da fotossíntese (Quadro 7), frequentemente relatada pela presença de metais pesados, conduz a uma diminuição de açúcares solúveis (glicose, frutose e sacarose) nas partes aéreas das plantas. Tanto quanto se sabe, a inibição da translocação de fotoassimilados das folhas para os restantes órgãos acaba por se traduzir em menores desenvolvimentos e rendimentos finais. Por outro lado, a acumulação de hidratos de carbono na superfície assimiladora também pode provocar a redução da taxa fotossintética das plantas por retroação negativa.

No que se refere à estimativa da área foliar, observou-se que as plantas testadas com Zn expressaram menores valores de LAI no início da fase de encanamento, sendo este efeito acentuado nas plantas testadas com maiores concentrações (Zn ++) (Quadros 4 e 5). Mašev e

Kutáček (1966), num estudo em plantas de cevada, verificaram que os teores de auxinas eram proporcionalmente mais afetados quando submetidas a concentrações crescentes de Zn. Presume-se, portanto, que as plantas testadas com Zn supra ótimo desfavoreceram a síntese desta hormona de crescimento, a qual, dentro de limites ótimos, têm como principal função estimular os processos de alongamento celular (Cato, 2006; Silva, 2014). Com efeito, os menores valores de LAI podem, provavelmente, estar associados ao maior número de caules observados no tratamento com a concentração mais elevada de Zn (0,024 mM) (Quadro 2). Esta suposição é baseada nos resultados obtidos por Almeida e Mundstock (2001) que constataram que a qualidade da luz interfere no desenvolvimento de novas plantas. De facto, verificou-se um maior número de "afilhos" nas plantas testadas com 0,024 mM de Zn, as quais revelaram menores valores de LAI (Quadros 4 e 5) e um semelhante teor de clorofilas (Quadro 6) quando comparados com as plantas controlo. Contudo, a atestar pelos valores de altura e respetiva matéria seca, verifica-se que as novas plantas resultantes destas concentrações apresentam colmos mais frágeis e delgados e consequentemente, mais suscetíveis a acama. Por outro lado, em plantas testadas com 0,012 mM de Zn constata-se uma redução na formação de novos colmos. Estes resultados parecem ir de encontro com as afirmações de Sampaio (1990). Estas plantas, quando comparadas as duas concentrações utilizadas, apresentam um maior LAI, o que altera a intensidade e a qualidade da luz na base das plantas, onde se localizam os rebentos, comprometendo o desenvolvimento destes. De acordo com Almeida e Mundstock (2001), acrescenta-se ainda que uma melhoria da qualidade de luz, para além de promover o aparecimento de "afilhos", favorece uma distribuição mais equilibrada de matéria seca entre estes e o colmo principal. Por outro lado, quando a qualidade da luz é reduzida e há existência de filtros verdes na entrelinha dá-se uma priorização de acúmulo de matéria seca no colmo principal, levando à morte de caules auxiliares.

Da análise feita aos teores de clorofila, verificou-se que as folhas das plantas resultantes de sementes testadas com Zn ficaram ligeiramente mais cloróticas (Quadro 8), apesar de não diferirem significativamente do ponto de vista estatístico. Estes resultados corroboram em parte os que foram obtidos por Zhao *et al.* (2011) em ensaios de plantas de trigo submetidas a concentrações crescentes de Zn. Mirshekali *et al*. (2012) fundamenta este comportamento referindo que a exposição a metais pesados causa a inibição de enzimas importantes na biossíntese das moléculas de clorofila, tais como a ácido delta-aminolevulínico desidratase (ALA-desidratase) e a protoclorofilida redutase. Uma vez mais, devido à similaridade bastante evidente do raio iónico, estes metais comprometem o fornecimento de Fe^{2+} (Mirshekali *et al*.,

2012). A substituição de Fe por Zn induz à deficiência do primeiro e, portanto, a uma diminuição na síntese de clorofila (Pushnik *et al*., 1984).

Os resultados das trocas gasosas permitiram constatar que o efeito do Zn promoveu um decréscimo significativo da atividade fotossintética. Segundo Sidhu (2016), a inibição da atividade fotossintética na presença deste elemento está, muitas vezes, associada à diminuição da síntese de pigmentos de clorofila e carotenoides, à interferência das atividades de enzimas relacionadas com o ciclo de Calvin, ao impedimento no transporte de eletrões e ao fecho dos estomas restringindo a fixação de CO_2. Vários autores como Khudsar *et al.* (2004) e Dhir *et al.* (2008) verificaram que os decréscimos observados da atividade fotossintética se deviam ao efeito do Zn na capacidade carboxilativa da Rubisco. Monnet *et al.* (2001) observaram, em estudos realizados com azevém, que o efeito do Zn inibiu significativamente a capacidade da RuBP carboxilase, enquanto a capacidade da RuBP oxigenase se manteve inalterada. Estes explicaram ainda que a presença de elementos potencialmente tóxicos pode inibir a atividade da RuBisCo devido à substituição de Mg^{2+} levando a uma menor afinidade desta enzima com o CO_2. Contudo, no presente estudo, a redução da atividade fotossintética esteve apenas relacionada com os menores valores de condutância estomática observados, a julgar pela análise conjunta das variações de g_s, A/g_s e C_i/C_a. Com efeito, em ambas as concentrações testadas verificou-se uma redução da condutância estomática em cerca de 40%, não tendo havido influência da aplicação de Zn em A/g_s e C_i/C_a. Uma vez mais, sendo o g_s um indicador fortemente relacionado com o teor de água nas folhas (Lawlor e Cornic, 2002), presume-se que, o efeito do Zn comprometeu as relações hídricas das plantas, reduzindo o teor de água nas folhas. Esta suposição pode refletir em grande parte os resultados acima descritos por Mahmood *et al.* (2007) que explicaram que o Zn, dentro desta gama de concentrações, tinha um efeito redutor no sistema radicular, diminuindo assim a capacidade das plantas no processo de absorção de água. Também Sharma *et al.* (2010) afirmaram que esta redução de g_s em paralelo com a redução de E pode ser atribuída a possíveis danos nas raízes provocados por metais pesados. Sagardoy *et al.,* (2010) apontaram ainda que altos níveis de Zn influenciam o bloqueio do xilema, comprometendo assim o estado hídrico foliar. De outra forma, Sargadoy *et al.,* (2010) explicaram que, em altas concentrações de Zn, a condutância estomática pode ser comprometida devido ao reduzido número e tamanho das células oclusivas. Todos estes fatores podem perturbar o funcionamento estomático, resultando numa diminuição da taxa de transpiração e da eficiência fotossintética.

Do ponto de vista das reações fotoquímicas da fotossíntese, vários autores identificaram efeitos adversos em diferentes culturas devido às altas concentrações de Zn. Monnet *et al.* (2001) verificaram, em plantas de azevém, declínios de F_v/F_m devido a um aumento em F_0 e a uma redução de F_m. Os autores explicaram que os maires valores de F_0 podem resultar de alterações nos centros de reação do PSII ou serem devido a uma redução na transferência de energia do sistema antena para os centros de reação. Já os decréscimos de F_m sugerem uma alteração na estrutura das membranas tilacoidais, afetando o desempenho da componente fotoquímica da fotossíntese. Também Xu *et al.* (2013) verificaram que concentrações entre 15 e 150 μM de Zn provocaram danos nos centros de reação do PSII, reduzindo a eficiência fotossintética em plantas de *Hydrilla verticillata*. Em plantas de ervilha, Szalontai *et al.* (1999) constataram que o efeito do Zn comprometeu a integridade da membrana dos tilacoides, inibindo o transporte de eletrões. Contudo, no presente estudo, a análise efetuada às variáveis da fluorescência da clorofila *a* revelou-se conclusiva, tendo-se verificado que ambas as concentrações de Zn não provocaram diferenças significativas nos parâmetros avaliados quando comparados com o tratamento controlo.

CAPÍTULO VII

7. Conclusões

Com o presente estudo foi possível concluir que tanto o selénio como o zinco influenciam a fisiologia de plantas de trigo.

Nas plantas resultantes de sementes testadas com Se observaram-se os resultados mais satisfatórios, atendendo a que o crescimento em altura e o peso seco das plantas apresentaram maiores valores. Assim, confirmou-se a importância que este elemento apresenta no estabelecimento e posterior vigor das plantas, assim como o provável papel vital no combate à seca. No que diz respeito à avaliação dos parâmetros fisiológicos, observou-se a mesma tendência. O efeito do Se aumentou a área foliar, teor de pigmentos fotossintéticos e promoveu as trocas gasosas. Contudo, no que se refere ao funcionamento do aparelho fotossintético os valores registados não permitiram obter conclusões sólidas. Apesar do trigo responder positivamente a uma gama alargada de concentrações de Se (2,5 e 25 mM), foi a menor concentração que promoveu o maior desenvolvimento.

Por outro lado, apesar de se conhecer a essencialidade do Zn em plantas, conclui-se que ambas as concentrações utilizadas se mostraram tendencialmente supra ótimas. Com efeito, as plantas de trigo apresentaram uma baixa tolerância às concentrações testadas, restringindo o seu crescimento e acumulação de matéria seca. Também nos parâmetros fisiológicos, ambas as concentrações de Zn ensaiadas comprometeram as trocas gasosas de CO_2 e H_2O entre as folhas e a atmosfera.

Finalmente, em termos de rendimentos finais e valor nutritivo, o presente estudo não permite tirar conclusões claras, sendo necessária análises mais específicas e em fases mais avançadas, nomeadamente ao nível da quantificação do teor dos minerais estudados nos diferentes órgãos da planta para se aferir se as concentrações estudadas são adequadas e qual a mobilidade destes nutrientes dentro da planta. Estando este trabalho inserido numa linha de investigação que visa a publicação de duas teses de doutoramento, levadas a cabo pelos Mestres Ivo Pavia e Luís Rocha, estes temas mais específicos e aprofundados serão certamente aí mais discutidos.

BIBLIOGRAFIA

Acevedo, E., Silva, P. e Silva, H. (2002). Wheat growth and physiology. In C. Curtis, S. Rajara e H. Macpherson (Eds.), *Bread wheat – improvement and production.* Rome: FAO. 39-70.

Ahmad, R., Waraich, E. A., Nawaz, F., Ashraf, M. Y. e Khalid, M. (2016). Selenium (Se) improves drought tolerance in crop plants–a myth or fact? *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(2), 372-380.

Alberto, C. M., Streck, N. A., Walter, L. C., Rosa, H. T., Brackmann, A., Oliveira, F. B., Zanon, A. J. e Fagundes, L. K. (2009). Resposta à vernalização de cultivares brasileiras de trigo. *Bragantia*, 68(2): 535-543.

Alloway, B. J. (2004). *Zinc in Soils and Crop Nutrition*. Brussels, Belgium: International Zinc Association.

Alloway, B. J. (2009). Soil factors associated with zinc deficiency in crops and humans. *Environmental Geochemistry and Health*, 31(5): 537–548.

Almeida, M. L. D. e Mundstock, C. M. (2001). Light quality affects tillering on wheat when grown under competition. *Ciência Rural*, 31(3), 401-408.

Badr, A. e El-Shazly, H. (2012). Molecular approaches to origin, ancestry and domestication history of crop plants: Barley and clover as examples. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, *10(1)*, 1-12.

Bagde, V. L. e Borkar, D. B. (2013). Biotechnological Interventions for Biofortification. *Biotechnology*, 2(10).

Baker, N.R. (2008). Chlorophyll Fluorescence: A Probe of Photosynthesis In Vivo. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59: 89-113.

Balal, R. M., Shahid, M. A., Javaid, M. M., Iqbal, Z., Anjum, M. A., Garcia-Sanchez, F. e Mattson, N. S. (2016). The role of selenium in amelioration of heat-induced oxidative damage in cucumber under high temperature stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(6), 158.

Bilger, W. e Schreiber, U. (1986). Energy-dependent quenching of dark-level chlorophyll fluorescence in intact leaves. *Photosynth. Res*., 10: 303-308.

Björkman, O. e Demmig, B. (1987). Photon yield of O2 evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta*, 170: 489-504.

Borges, I. S., Dias, J. M. G., Zuque, F. T. S. e Zuque, M. A. S. (2016). Função do mineral zinco no organismo humano. *Conexão Eletrônica*, 13(1).

Bouis, H. E. e Welch, R. M. (2010). Biofortification – A sustainable agricultural Strategy for reducing micronutriente malnutrition in the global south. *Crop Science*, 50: 20-32.

Bouis, H. E., Christine, H., McClafferty, B., Meenakshi, J. V. e Pfeiffer, W. H. (2011). Biofortification: A new tool to reduce micronutriente malnutrition. *Food and Nutrition*, 32(1): 31-40.

Bowden, P., Edwards, J., Ferguson, N., McNee, T., Manning, B., Roberts, K., Schipp, A., Schulze, K. e Wilkins, J. (2007). Retirado de: https://www.dpi.nsw.gov.au/__data/assets/pdf_file/0006/449367/Procrop-wheat-growth-and-development.pdf

Broadley, M. R., White, P. J., Bryson, R. J., Meacham, M. C., Bowen, H. C., Johnson, S. E., Hawkesford, M. J., McGrath, S. P., Zhao, F., Breward, N., Harriman, M. e Tucker, M. (2006). Biofortification of UK food crops with selenium. *Proceedings of the Nutrition Society*, 65(2): 169–181.

Broadley, M. R., White, P. J., Hammond, J. P., Zelko, I. e Lux, A. (2007). Zinc in plants. *New Phytologist*, 173: 677–702.

Calado, J. M. G., Basch, G. e Carvalho, M. (2007). Efeito da data de sementeira na produtividade de trigo mole (*Triticum aestivum* L.) em condições mediterrânicas. *Revista de Ciências Agrárias*, 44-56.

Cappellari, I. (2012). *Genótipos de trigo (Triticum aestivum l.) submetidos a aplicação de trinexapac-ethyl em diferentes densidades de semeadura.* Trabalho de Conclusão de Curso em Agronomia, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Ijuí, 38 p.

Cato, S. C. (2006). *Ação de bioestimulante nas culturas do amendoinzeiro, sorgo e trigo e interações hormonais entre auxinas, citocininas e giberelinas* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).

Coco, J. A. C. (2013). *Adaptabilidade e estabilidade de produção de trigo mole – interação genótipo x ambiente*. Dissertação de mestrado em Agricultura Sustentável. Instituto Politécnico de Portalegre, Elvas, 113 p.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. (2017). *A cultura do trigo*. Retirado de: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_05_03_16_09_46_a_cultura_do_trigo_versao_digital_nova_logo.pdf

Cowan, I. R. (1978). Stomatal behaviour and environment. *Advances in Botanical Research*, 4, 117-228.

Cubadda, F., Aureli, F., Ciardullo, S., D'Amato, M., Raggi, A., Acharya, R., Reddy, R. A. V. e Prakash, N. T. (2010). Changes in selenium speciation associated with increasing tissue concentrations of selenium in wheat grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(4): 2295-2301.

Daughtry, C. S. T., Walthall, C. L., Kim, M. S., De Colstoun, E. B. e McMurtrey Iii, J. E. (2000). Estimating corn leaf chlorophyll concentration from leaf and canopy reflectance. *Remote Sensing of Environment*, 74(2), 229-239.

Dedecca, M. e Púrchio, M. J. (1952). Variedade agrícolas de trigo (*Triticum aestivum* L.): caracterização botânica de algumas variedades em experimentação em São Paulo. *Bragantia*, 12(1-3): 19-53.

Dhir, B., Sharmila, P. e Saradhi, P. P. (2008). Photosynthetic performance of Salvinia natans exposed to chromium and zinc rich wastewater. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 20(1), 61-70.

Dubcovsky, J. e Dvorak, J. (2007). Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. *Science*, 316(5833): 1862-1866.

Ducsay, L. e Ložek, O. (2006). Effect of selenium foliar application on its content in winter wheat grain. *Plant Soil and Environment*, 52(2): 78-82

Evers, T. e Millar, S. (2002). Cereal grain structure and development: some implications for quality. *Journal of Cereal Science*, *36*(3): 261-284.

Farooq, M., Wahid, A. e Siddique, K. H. M. (2014). Physiology of grain development in cereals. *Handbook of Plant and Crop Physiology,* 301-308.

Fitzgerald-Moore, P. e Parai, B. J. (1996). *The green revolution*. Retirado de: http://people.ucalgary.ca/~pfitzger/green.pdf

Franceschi, L. (2009). *Adaptabilidade e efeito de variáveis meteorológicas sobre a qualidade tecnológica de cultivares de trigo no estado do Paraná*. Dissertação de mestrado em Agronomia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 103 p.

Galinha, C. I. A. L. (2011). *Diferentes técnicas radioanalíticas para determinação de selénio em amostras de cereais.* Dissertação de mestrado em Engenharia Biológica. Universidade Técnica de Lisboa, 84 p.

Galinha, C., Freitas, M. C. e Pacheco, A. M. (2013). Elemental characterization of bread and durum wheat by instrumental neutron activation analysis. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 297(2): 221-226.

Genty, B., Briantais, J.M. e Baker, N.R. (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta*., 990: 87-92.

González, F. G., Slafer, G. A. e Miralles, D. J. (2002). Vernalization and photoperiod responses in wheat pre-flowering reproductive phases. *Field Crops Research*, 74(2-3): 183-195.

Gupta, U. C. e Gupta, S. C. (2000). Selenium in soils and crops, its deficiencies in livestock and humans: implications for management. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 31(11-14): 1791-1807.

Habibi, G. (2013). Effect of drought stress and selenium spraying on photosynthesis and antioxidant activity of spring barley/Ucinek susnega stresa in skropljenja s selenom na fotosintezo in antioksidativno aktivnost jarega jecmena. Acta Agriculturae Slovenica, 101(1), 31.

Hajiboland, R., Sadeghzadeh, N., Ebrahimi, N., Sadeghzadeh, B. e Mohammadi, S. A. (2015). Influence of selenium in drought-stressed wheat plants under greenhouse and field conditions. *Acta Agriculturae Slovenica*, *105*(2), 175-191.

Hänsch, R. e Mendel, R. R. (2009). Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current Opinion in Plant Biology*, 12(3): 259-266.

Hussain, S., Khan, F., Hussain, H. A. e Nie, L. (2016). Physiological and biochemical mechanisms of seed priming-induced chilling tolerance in rice cultivars. *Frontiers in Plant Science*, 7, 116.

Inocencio, M. F., (2014). *Frações de zinco no solo e biofortificação agronômica com selênio, ferro e zinco em soja e trigo*. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 88 p.

Juneau, P., Green, B.R. e Harrison, P.J. (2005). Simulation of Pulse-Amplitude- Modulated (PAM) fluorescence: Limitations of some PAM-parameters in studying environmental stress effects. *Photosynthetica*, 43(1): 75-83.

Kápolna, E., Hillestrøm, P. R., Laursen, K. H., Husted, S. e Larsen, E. H. (2009). Effect of foliar application of selenium on its uptake and speciation in carrot. *Food Chemistry*, 115(4): 1357-1363.

Kashin, V. K. e Shubina, O. I. (2011). Biological effect and selenium accumulation in wheat under conditions of selenium deficient biogeochemical province. *Chemistry for Sustainable Development*, 19(2), 145-150.

Kaur, S., Kaur, N., Siddique, K. H. e Nayyar, H. (2016). Beneficial elements for agricultural crops and their functional relevance in defence against stresses. *Archives of Agronomy and Soil Science.*, 62(7): 905-920.

Kearney, J. (2010). Food consumption trends and drivers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B.*, 365(1554): 2793-2807.

Khaliq, A., Aslam, F., Matloob, A., Hussain, S., Geng, M., Wahid, A. e Rehman, H. (2015). Seed priming with selenium: consequences for emergence, seedling growth, and biochemical attributes of rice., *Biological Trace Element Research*, 166(2), 236-244.

Khan, M. I. R., Nazir, F., Asgher, M., Per, T. S., e Khan, N. A. (2015). Selenium and sulfur influence ethylene formation and alleviate cadmium-induced oxidative stress by improving proline and glutathione production in wheat. Journal of Plant Physiology, 173, 9-18.

Khudsar, T., Iqbal, M. e Sairam, R.K. (2004). Zinc-induced changes in morpho-physiological and biochemical parameters in Artemisia annua. *Biologia Plantarum*, 48(2), 255-260.

Läuchli, A. (1993). Selenium in plants: uptake, functions, and environmental toxicity. *Plant Biology*, 106(6): 455-468.

Lawlor, D. W. e Cornic, G. (2002). Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell & Environment*, 25(2), 275-294.

Lichtenthaler, H. K., Buschmann, C. e Knapp, M. (2005). How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio R Fd of leaves with the PAM fluorometer. *Photosynthetica*, 43(3), 379-393.

Liu, D., Liu, Y., Zhang, W., Chen, X. e Zou, C. (2017). Agronomic approach of zinc biofortification can increase zinc bioavailability in wheat flour and thereby reduce zinc deficiency in humans. *Nutrients*, *9*(5), 465.

Mafra, D. e Cozzolino, S. M. F. (2004). The importance of zinc in human nutrition. *Revista de Nutrição*, 17(1): 79-87.

Mahmood, T., Islam, K. R. e Muhammad, S. (2007). Toxic effects of heavy metals on early growth and tolerance of cereal crops. *Pakistan Journal of Botany*, 39(2), 451.

Malagoli, M., Schiavon, M. e Pilon-Smits, E. A. (2015). Effects of selenium biofortification on crop nutritional quality. *Frontiers in Plant Science*, 6(280).

Masarovičová, E. e Kráľová, K. (2012). Plant-heavy metal interaction: phytoremediation, biofortification and nanoparticles. In G. Montanaro e B. Dichio (Eds), *Advances in Selected Plant Physiology Aspects*, 75-102.

Mašev, N. e Kutáček, M. (1966). The effect of zinc on the biosynthesis of tryptophan, andol auxins and gibberellins in barley. *Biologia Plantarum*, 8(2), 142.

Maxwell, K. e Johnson, G.N. (2000). Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany*, 345(51): 659-668.

McCauley, A., Jones, C. e Jacobsen, J. (2009). Soil pH and organic matter. *Nutrient Management Module*, 8: 1-12.

Meena, H. M., Sharma, R. P., Meena, D. S., Sepehya, S. e Yadav, D. K. (2017). Biofortification: A novel approach for enrichment of cereal grains with Zn and Fe. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*., 6(4): 955-962.

Mirshekali, H., Hadi, H. A. S. H. E. M., Amirnia, R. e Khodaverdiloo, H. (2012). Effect of zinc toxicity on plant productivity, chlorophyll and Zn contents of sorghum (Sorghum bicolor) and common lambsquarter (Chenopodium album). *International Journal of Agriculture: Research and Review*, 2(3), 247-254.

Monnet, F., Vaillant, N., Vernay, P., Coudret, A., Sallanon, H., e Hitmi, A. (2001). Relationship between PSII activity, CO2 fixation, and Zn, Mn and Mg contents of Lolium perenne under zinc stress. *Journal of Plant Physiology*, 158(9), 1137-1144.

Monteiro, J. E. (2009). *Agrometeorologia dos cultivos: o fator meteorológico na produção agrícola*.

Mourinho, M. R. P. P. (2016). *Biofortificação do grão de Triticum aestivum L. em zinco*. Tese de Douturamento. Faculdade de Ciências e Tecnologias, Lisboa, 177 p.

Müller, O. e Krawinkel, M. (2005). Malnutrition and health in developing countries. *Canadian Medical Association Journal*, 173(3): 279-286.

Mulualem, T. (2015). Application of bio-fortification through plant breeding to improve the value of staple crops. *Biomedicine and Biotechnology*, 3(1), 11-19.

Murchie, E. H. e Lawson, T. (2013). Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany*., 64(13), 3983-3998.

Navarro-Alarcon, M. e Cabrera-Vique, C. (2008). Selenium in food and the human body: a review. *Science of the Total Environment*, 400(1-3): 115-141.

Nawaz, F., Ahmad, R., Ashraf, M. Y., Waraich, E. A. e Khan, S. Z. (2015). Effect of selenium foliar spray on physiological and biochemical processes and chemical constituents of wheat under drought stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113, 191-200.

Nawaz, F., Ashraf, M. Y., Ahmad, R. e Waraich, E. A. (2013). Selenium (Se) seed priming induced growth and biochemical changes in wheat under water deficit conditions. *Biological Trace Element Research*, 151(2), 284-293.

Nawaz, F., Ashraf, M. Y., Ahmad, R., Waraich, E. A., Shabbir, R. N. e Hussain, R. A. (2017). Selenium supply methods and time of application influence spring wheat (Triticum aestivum L.) yield under water deficit conditions. *The Journal of Agricultural Science*, 155(4), 643-656.

Nawaz, F., Naeem, M., Ashraf, M. Y., Tahir, M. N., Zulfiqar, B., Salahuddin, M., Shabbir, R. N. e Aslam, M. (2016). Selenium supplementation affects physiological and biochemical processes to improve fodder yield and quality of maize (Zea mays L.) under water deficit conditions. Frontiers in Plant Science, 7, 1438.

Nielsen, F. H. (2012). History of zinc in agriculture. *Advances in Nutrition*, 3(6): 783-789.

Öquist, G. e Wass, R., (1988). A portable, microprocessor operated instrument for measuring chlorophyll fluorescence kinetics in stress physiology. *Physiologia Plantarum*, 73: 211-217.

Palmgren, M. G., Clemens, S., Williams, L. E., Krämer, U., Borg, S., Schjørring, J. K. e Sanders, D. (2008). Zinc biofortification of cereals: problems and solutions. *Trends in Plant Science*, 13(9): 464-473.

Pushnik, J. C., Miller, G. W. e Manwaring, J. H. (1984). The role of iron in higher plant chlorophyll biosynthesis, maintenance and chloroplast biogenesis. *Journal of Plant Nutrition*, 7(1-5), 733-758.

Rattan, R. K., Datta, S. P. e Sharma, K. L. (2014). Zinc Sorption Behavior in Soils with Divergent Characteristics. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 45(20): 2697-2711.

Rayman, M. P. (2000). The importance of selenium to human health. *The Lancet*, 356(9225), 233-241.

Rehman, H. U., Aziz, T., Farooq, M., Wakeel, A. e Rengel, Z. (2012). Zinc nutrition in rice production systems: a review. *Plant and Soil*, 361(1-2), 203-226.

Rivas, J. (2000). La luz y el aparato fotossintético. In: *Fundamentos de fisiologia vegetal*. Azcón-bielo, J. e Tlón, M. (Eds), Ediciones Universitat de Barcelona, McGraw-Hill, Barcelona, 522 p.

Rodrigues, M. A. R. (1997). *Análise de plantas – Potencialidades e limitações*. Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança.

Roohani, N., Hurrell, R., Kelishadi, R. e Schulin, R., 2013. Zinc and its importance for human health: An integrative review. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 18(2): 144.

Rosado, J. L., Hambidge, K. M., Miller, L. V., Garcia, O. P., Westcott, J., Gonzalez, K., Conde, J., Hotz, C., Wolfgang, P., Ortiz-Monasterio, I. e Krebs, N. F. (2009). The quantity of zinc absorbed from wheat in adult women is enhanced by biofortification. *The Journal of Nutrition*, 139(10), 1920-1925.

Sagardoy, R., Vázquez, S., Florez-Sarasa, I. D., Albacete, A., Ribas-Carbó, M., Flexas, J., Abadía, J. e Morales, F. (2010). Stomatal and mesophyll conductances to CO2 are the main limitations to photosynthesis in sugar beet (Beta vulgaris) plants grown with excess zinc. *New Phytologist*, 187(1), 145-158.

Sampaio, J. A. (1990). *A cultura do trigo*. Lisboa, Ministério da Agricultura, Pescas e Alimentação, 181 p.

Santos, J. O. D. (2014). *Deficiência e excesso de zinco em mudas de cafeeiro: metabolismo de carboidratos e respostas antioxidantes*.

Scheeren, P. L., Castro, R. L., Caierão, E. (2015). Botânica, morfologia e descrição fenotípica. *Embrapa Trigo-Capítulo em livro científico (ALICE).*

Scheuer, P. M., Francisco, A. D., Miranda, M. D. e Limberger, V. M. (2011). Trigo: Características e utilização na panificação. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 13(2): 211-222.

Schiavon, M., dall'Acqua, S., Mietto, A., Pilon-Smits, E. A., Sambo, P., Masi, A. e Malagoli, M. (2013). Selenium fertilization alters the chemical composition and antioxidant constituents of tomato (Solanum lycopersicon L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(44): 10542-10554.

Schulte, E. E. (2004). Understanding plant nutrients, soil and applied Zn. Retirado de: http://corn.agronomy.wisc.edu/Management/pdfs/a2528.pdf

Sharma, R. K., Agrawal, M. e Agrawal, S. B. (2010). Physiological and biochemical responses resulting from cadmium and zinc accumulation in carrot plants. *Journal of Plant Nutrition*, 33(7), 1066-1079.

Shewry, P. R. (2009). Wheat. *Journal of Experimental Botany*, 60(6): 1537-1553.

Shewry, P. R. e Hey, S. J. (2015). The contribution of wheat to human diet and health. *Food and Energy Security*, 4(3): 178-202.

Shibghatallah, M. A. H., Khotimah, S. N., Suhandono, S., Viridi, S. e Kesuma, T. (2013). Measuring leaf chlorophyll concentration from its color: A way in monitoring environment change to plantations. In *AIP Conference Proceedings*, 1554(1), 210-213.

Shiferaw, B., Smale, M., Braun, H. J., Duveiller, E., Reynolds, M. e Muricho, G. (2013). Crops that feed the world 10. Past successes and future challenges to the role played by wheat in global food security. *Food Security*, 5(3): 291-317.

Sidhu, G. P. S. (2016). Physiological, biochemical and molecular mechanisms of zinc uptake, toxicity and tolerance in plants. *Journal of Global Biosciences*, 5(9), 4603-4633.

Silva, P. K. (2014). *Biorreguladores aplicados em diferentes estádios fenológicos do trigo e seu efeito no desenvolvimento da planta e na qualidade de farinha*.

Singh, U., Praharaj, C. S., Singh, S. S., Bohra, A. e Shivay, Y. S. (2015). Biofortification of pulses: Strategies and challenges. In *Proceedings of The Second International Conference on Bio-Resource and Stress Management*, Hyderabad, India., 50-55.

Slafer, G. A. e Rawson, H. M. (1994). Sensitivity of wheat phasic development to major environmental factors: a re-examination of some assumptions made by physiologists and modellers. *Functional Plant Biology*, 21(4): 393-426.

Soares, C. R. F. S., Grazziotti, P. H., Siqueira, J. O., Carvalho, J. D. e Moreira, F. M. S. (2001). Toxidez de zinco no crescimento e nutrição de Eucalyptus maculata e Eucalyptus urophylla em solução nutritiva. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 36(2), 339-348.

Souza, E. F. C. e Silva, M. A. (2013). Ecofisiologia tritícola. *Varia Scientia Agrárias*, 3(1): 171-187.

Souza, G. A. (2013). *Biofortificação da cultura do trigo com zinco, selênio e ferro: explorando o germoplasma brasileiro*. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 112 p.

Stevenson, L., Phillips, F., O'sullivan, K. e Walton, J. (2012). Wheat bran: its composition and benefits to health, a European perspective. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63(8): 1001-1013.

Szalontai, B., Horváth, L. I., Debreczeny, M., Droppa, M. e Horváth, G. (1999). Molecular rearrangements of thylakoids after heavy metal poisoning, as seen by Fourier transform infrared (FTIR) and electron spin resonance (ESR) spectroscopy. *Photosynthesis Research*, 61(3), 241-252.

Teimouri, S., Hasanpour, J. e Tajali, A. A. (2014). Effect of Selenium spraying on yield and growth indices of wheat (Triticum aestivum L.) under drought stress condition. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, 2(6), 2091-2103.

Thompson, B. (2007). Food-based approaches for combating iron deficiency. In:. *Nutritional anemia* Zimmermann, M. B. e Hurrel, R. F. (Eds), Basel, Switzerland: Sight and Life Press, 337-358.

Tottman, D. R. (1987). The decimal code for the growth stages of cereals, with illustrations. *Annals of Applied Biology*, 110(2): 441-454.

Valença, A. W., Bake, A., Brouwer, I. D. e Giller, K. E. (2017). Agronomic biofortification of crops to fight hidden hunger in sub-Saharan Africa. *Global Food Security*, 12: 8-14.

Valério, I. P., Carvalho, F. I. F., de Oliveira, A. C., Benin, G., Maia, L. C., Silva, J. A. G., Schmidt D. M. e Silveira, G. (2009). Factors related to tiller formation and development in wheat. *Semina: Ciências Agrárias*, 30(1): 1207-1218.

Von Caemmerer, S. V. e Farquhar, G. D. (1981). Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta*, 153(4), 376-387.

White, P. J. e Broadley, M. R. (2009). Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets–iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytologist*, 182(1): 49-84.

White, P. J., 2015. Selenium accumulation by plants. *Annals of Botany*, 117: 217-235.

Xu, Q., Chu, W., Qiu, H., Fu, Y., Cai, S., & Sha, S. (2013). Responses of *Hydrilla verticillata* (Lf) Royle to zinc: in situ localization, subcellular distribution and physiological and ultrastructural modifications. *Plant Physiology and Biochemistry*, 69, 43-48.

Yao, X., Chu, J. e Wang, G. (2009). Effects of selenium on wheat seedlings under drought stress. *Biological Trace Element Research*, 130, 283-290.

Zadoks, J. C., Chang, T. T. e Konzak, C. F. (1974). A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research*, 14, 415-421.

Zeng, H. (2009). Selenium as an essential micronutrient: roles in cell cycle and apoptosis. *Molecules*, 14: 1263-1278.

Zhao, A. Q., Bao, Q. L., Tian, X. H., Lu, X. C. e William, J. G. (2011). Combined effect of iron and zinc on micronutrient levels in wheat (Triticum aestivum L.). *Journal of Environmental Biology*, 32(2), 235-239.

Zhu, Y. G., Pilon-Smits, E. A., Zhao, F. J., Williams, P. N. e Meharg, A. A. (2009). Selenium in higher plants: understanding mechanisms for biofortification and phytoremediation. *Trends in Plant Science*, 14(8): 436-442.

Endereços On-Line:

Brasted, R. C., 2018. Selenium. Encyclopædia Britannica, inc. Retirado de: https://www.britannica.com/science/selenium [Consultado a 13 de Fevereiro de 2018].

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2017). Retirado em: http://www.fao.org/home/en/ [Consultado a 24 de Outubro de 2017].

Fowler, D. B. (2016). Winter Cereal Production. Retirado de: https://www.usask.ca/agriculture/plantsci/winter_cereals/winter-wheat-production-manual/index.php [Consultado a 22 de Outubro de 2017].

Sementes Webber (2018). Retirado de: http://sementeswebber.com.br/inicial [Consultado a 17 de Janeiro de 2018].