

João Miguel Rodrigues Costa

*A consociação de espécies como ferramenta para a
otimização do uso do ferro*



Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Hortofruticultura

2021

Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Mestrado em Hortofruticultura
Ano letivo 2020/2021

*A consociação de espécies como ferramenta para a
otimização do uso do ferro*

Dissertação

Orientador: Professor Doutor Pedro José Correia

Discente: João Miguel Rodrigues Costa

2021

A consociação de espécies como ferramenta para a otimização do uso do ferro

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

© João Miguel Rodrigues Costa

“A Universidade do Algarve reserva para si o direito, em conformidade com o disposto no Código do Direito de Autor e dos Direitos Conexos, de arquivar, reproduzir e publicar a obra, independentemente do meio utilizado, bem como de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição para fins meramente educacionais ou de investigação e não comerciais, conquanto seja dado o devido crédito ao autor e editor respetivos”

*A consociação de espécies como ferramenta para a otimização
do uso do ferro*

Ao meu pai, este
trabalho é também fruto da tua vida.

Agradecimentos

Ninguém vence sozinho, nem no campo, nem na vida!

(Papa Francisco)

Esta dissertação do mestrado nada seria sem o contributo precioso de várias pessoas. Desde já o meu obrigado!

Primeiramente um agradecimento profundo ao Doutor Professor Pedro Correia por toda a disponibilidade, ajuda e preocupação. Muito obrigado pelas suas valiosas correções e ideias, mas também pela sua simplicidade e proximidade que sempre me colocaram completamente à vontade.

À mestre Teresa Saavedra pela simpatia e por todo o apoio imprescindível, sem o qual não conseguiria de algum modo terminar este trabalho. Obrigado por todo o conhecimento transmitido, pela constante disponibilidade e pelo acompanhamento personalizado em todas as etapas da dissertação. Muito obrigado, Teresa.

À minha família e à Rita por todo o apoio e compreensão que demonstraram ao longo deste percurso. Foram a minha motivação e o meu suporte nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos, pelas inúmeras palavras de apoio e de estímulo.

E por fim o meu agradecimento os meus colegas, pelo constante desafio e partilha de conhecimentos ao longo do mestrado.

Deixo o meu carinho e gratidão a todos!

Resumo

A clorose férrica é um dos problemas agronômicos mais relevantes na região do Mediterrâneo, com elevadas prejuízos para as culturas. Face a esta carência, as plantas dividem-se em duas estratégias para solucionar este problema: Estratégia I ou estratégia de redução (dicotiledóneas) e estratégia II ou estratégia complexante (gramíneas). Nesta última, os fitosideróforos são excretados pelas raízes e dão origem a complexos estáveis de Fe, facilitando a sua absorção. Desenvolveu-se então, um ensaio com uma consociação entre *Poa pratensis* L. (nome comum: cabelo-de-cão-de-colmo-liso) (estratégia I) e *Brassica oleraceae* var. *italica* Plenck (nome comum: couve-brócolos) (estratégia II), de forma a testar a hipótese da hortícola conseguir beneficiar da formação destes complexos gerados pela gramínea. Este contemplou 6 modalidades, com 3 concentrações diferentes de Fe na solução nutritiva (Fe0, Fe1 e Fe5), cada concentração tinha: uma repetição em consociação (*P. pratensis* + *B. oleraceae*) e outra em monocultura (*B. oleraceae*), ambas em sistema hidropónico. Foram registados valores de SPAD (posteriormente convertidos em clorofila total), de atividade enzimática do quelato de Fe(III)-redutase (QFR) e de parâmetros de fluorescência e de biomassa. Os dados obtidos sugerem que os complexos de Fe formados ficaram disponíveis à absorção da hortícola, melhorando assim a absorção de Fe pela raiz. De forma a complementar este primeiro ensaio, realizou-se um segundo ensaio onde se testou a aplicação de dois extratos: um da parte aérea da *P. pratensis* e outro da parte radicular também da *P. pratensis*, numa hortícola em hidroponia com diferentes concentrações de Fe. Ao longo do ensaio foram realizadas 4 pulverizações à parte aérea num total de 20 ml de extrato por planta, logo após os primeiros sintomas de clorose férrica. Novamente, foram registados os valores de SPAD e de biomassa final. Os dados obtidos revelam um efeito ligeiramente positivo, mas transitório, consoante a modalidade. Tudo isto indica que mediante o contexto agronómico, a utilização de consociação com gramíneas pode substituir em parte a quantidade de quelatos aplicados nas culturas.

Palavras-chave: “clorose férrica”; “consociação”; “fitosideróforos”; “bioestimulante”

Abstract

Iron chlorosis is one of the most relevant agronomic problems in the Mediterranean region, with serious damage to crops. To cope with this problem, the plants are divided into two strategies to solve this problem: Strategy I or reduction strategy (dicots) and strategy II or complexing strategy (grasses). On this second strategy, the phytosiderophores are excreted by the roots and produce stable iron complexes, facilitating its absorption. In order to test the hypothesis of horticultural plants benefiting from this complexes, an intercropping essay was developed using *Poa pratensis* L. also known as Kentucky bluegrass (strategy I) and *Brassica oleraceae* var. *italica* Plenck also known as broccoli (strategy II). This included 6 treatments, with 3 different concentrations of iron in the nutrient solution (Fe0, Fe1 and Fe5). For each concentration plants were grown in intercropping system (*P. pratensis* + *B. oleraceae*) or in monoculture (*B. oleraceae*), both in hydroponic system. Values for SPAD (later converted to total chlorophyll), enzymatic activity of iron chelate reductase, fluorescence and biomass parameters were recorded. The data obtained revealed that the formed iron complexes were available to the dicot uptake, thus improving root iron uptake. In order to complement this first essay, a second experiment was established to test the application of two extracts: one from the aerial part of *P. pratensis* and the other from the root part also from *P. pratensis*, on *B. oleraceae*'s plants grown in hydroponics with different Fe concentrations. On this assay, 4 foliar sprays were done, totaling 20 ml of extract per plant, after the first symptoms of iron chlorosis. Again, SPAD and final biomass values were recorded. The data obtained revealed a positive but transitory effect, depending on the treatment. It is possible to conclude that, depending on the agronomic context, the use of intercropping with grasses can partly replace the amount of chelates used on crops.

Keywords: "Iron chlorosis"; "intercropping"; "phytosiderophores"; "biostimulant"

Índice de Figuras e Gráficos

	Página
Figura 3.1 Esquema explicativo do transporte do Fe na planta	5
Figura 3.2 Estratégia I e II das plantas, face à carência férrica	6
Figura 3.3 Sintomas da carência de Fe em diferentes espécies	8
Figura 3.4 Biossíntese dos ácidos mugineicos	11
Figura 4.1 Disposição do ensaio I na estufa	14
Figura 4.2 Suporte utilizado nas plantas no regime hidropónico	15
Figura 4.3 Germinação da <i>P. pratensis</i>	19
Figura 4.4 Resultado final da produção dos extratos	20
Figura 5.1 Formação de ápices secundários na hortícola	31
Figura 5.2 Via biossintética da família de fitosideróforos, os ácidos mugineicos	35
Figura 5.3 Biossíntese da auxina ácido indol-acético a partir de triptofano	35
Figura 5.4 Primeiros sintomas de clorose férrica no ensaio II	36
Figura 5.5 Diferença visual nas folhas novas entre as modalidades Fe1 e Fe1+PEF	39
Gráfico 4.1 Registo das T máx e min, e da HR média durante o ensaio I	16
Gráfico 4.2 Registo das T máx e min, e da HR média durante o ensaio II	20
Gráfico 5.1 Evolução das médias da clorofila total das folhas novas, no ensaio I	24
Gráfico 5.2 Atividade do enzima QFR, no ensaio I	28
Gráfico 5.3 Eficiência do fotossistema II, no ensaio I	33
Gráfico 5.4 Evolução das médias da clorofila total das folhas novas, no ensaio II	37

Índice de Tabelas

	Página
Tabela 4.1 Descrição das modalidades do ensaio I	13
Tabela 4.2 Descrição das modalidades do ensaio II	21
Tabela 4.3 Programação das leituras de SPAD e pulverizações	21
Tabela 5.1 Concentração média da clorofila total nas folhas novas da <i>B. oleraceae</i> , mediante modalidades, ao longo do ensaio I	25
Tabela 5.2 Resultados médios diferentes parâmetros da biomassa registrada no final do ensaio I	30
Tabela 5.3 Resultados médios da razão PR/PA, mediante modalidades, no ensaio I	31
Tabela 5.4 Resultados médios da fluorescência basal, mediante modalidades, no ensaio I	33
Tabela 5.5 Composição percentual dos extratos quanto à atividade quelante, aos fenóis totais e à concentração proteica	36
Tabela 5.6 Concentração média da clorofila total nas folhas novas da <i>B. oleraceae</i> , mediante modalidades, ao longo do ensaio II	38
Tabela 5.7 Resultados médios diferentes parâmetros da biomassa registrada no final do ensaio II	41

Índice

Dedicatória.....	IV
Agradecimentos.....	V
Resumo.....	VI
Abstract.....	VII
Índice de figuras e gráficos.....	VIII
Índice de tabelas.....	IX
Índice.....	X
Glossário de símbolos e abreviaturas.....	XII
1.Introdução	1
2. Objetivos	3
3. Revisão Bibliográfica.....	4
3.1 Ferro no solo	4
3.2 Dinâmica do Fe na planta e transporte raiz - parte aérea	4
3.3 Estratégia redutora e complexante	5
3.4 Clorose férrica e implicações agronômicas.....	7
3.4 Correção da clorose férrica	9
3.5 Caraterização dos fitosideróforos.....	10
3.6 Bioestimulantes	11
4. Material e Métodos	13
4.1 Ensaio I.....	13
4.2 Ensaio II	18
4.3 Análise Estatística	22
5. Resultados e Discussão	24
5.1 Ensaio I.....	24
5.1.1 Clorofila nas folhas novas na <i>B. oleraceae</i> L.....	24
5.1.3 Atividade da Quelato de Fe(III)-redutase.....	28
5.1.4 Morfologia e Biomassa Final	29
5.1.5 Fluorescência da clorofila	32
5.2 Ensaio II	34
5.2.1 Quantificação da Capacidade Quelante do Fe (II), do teor de fenóis totais e da concentração proteica nos extratos.....	34
5.2.2 Clorofila Folhas Novas.....	36
5.2.3 Morfologia e Biomassa Final	40

6. Conclusões e considerações finais	42
7. Referências bibliográficas	44

Glossário de Símbolos e Abreviaturas

A0 – Absorvância do controle

AExt – Absorvância na presença do extrato

BPDS - Dissulfonato de batofenantrolina

BSA – *Bovine Serum Albumin*

Ca (NO₃)₂ – Nitrato de Cálcio

Ca²⁺ - Ião Cálcio

CaCO₃ – Carbonato de Cálcio

CE – Condutividade Elétrica

CO₂ – Dióxido de Carbono

CTC – Capacidade de Troca Catiônica

CuSO₄ – Sulfato de Cobre

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

Fe – Ferro

Fe²⁺ - Ferro (II)

Fe³⁺ - Ferro (III)

Fe(OH)₃ – Hidróxido de Ferro

FeCl₂ – Cloreto de Ferro

Fe-EDDHA – Ácido etileno-diamina di-orto-hidroxi-fenil de ferro

Fe-EDDHMA – Ácido etileno-diamina di-orto-hidroxi-p-metilfenil de ferro

F₀ – Fluorescência basal

FRO - *Ferric reductase oxidase*

Fv/Fm – Eficiência do fotossistema II

GAE – *Galic acid equivalent*

H⁺ - Ião Hidrogénio

H₂O – Água

H₃BO₃ – Ácido Bórico

HCl – Ácido Clorídrico

HCO₃⁻ - Ião Carbonato

HEDTA – Ácido hidroxietileno-diamino - triacético

IC – *Intercropping*¹
KH₂PO₄ – Fosfato monopotássico
KNO₃ – Nitrato de Potássio
MC – *Monocropping*¹
MES - ácido 2-(N- morfolino)etanossulfônico
MgSO₄ – Sulfato de Magnésio
Mn – Manganês
MnCl₂ – Cloreto de Manganês
MoO₃ – Trióxido de Molibdênio
NaOH – Hidróxido de Sódio
PF – Peso Fresco
pH – Potencial de Hidrogênio iônico
PS – Peso Seco
PTFE – Politetrafluoretileno
QFR - Quelato de Fe(III)-Redutase (EC. 1.16.1.7)
R/A – Razão entre parte radicular e aérea
SPAD – Soil Plant Analysis Development
Tmax – Temperatura máxima
Tmin – Temperatura mínima
Zn – Zinco
ZnSO₄ – Sulfato de Zinco

1.Introdução

O ferro (Fe) é um elemento fundamental em inúmeros processos metabólicos e representa um importante constituinte celular em diversos organismos. O ferro é o quarto elemento mais abundante na litosfera e apesar das necessidades nutricionais das plantas serem reduzidas relativamente a este nutriente, é bastante frequente a sua deficiência no panorama da nutrição vegetal, revelando-se um problema agronómico recorrente (Pestana et al., 2011). Na população humana, a deficiência deste nutriente causa diversos problemas a nível nutricional, tais como a anemia, que em 2002 afetava cerca de 30 % da população (Hell & Stephan, 2003).

Assim, a carência deste micronutriente nas plantas não é um problema meramente agronómico, dadas as sérias complicações em toda a cadeia alimentar a jusante, visto que as culturas agrícolas são uma das fontes mais importantes de Fe para o mundo animal (Hell & Stephan, 2003).

Na nutrição vegetal, o Fe está classificado como um micronutriente e participa em vários processos bioquímicos, tais como a fotossíntese, a respiração, bem como a fixação do azoto atmosférico. Através da sua capacidade de alteração do seu estado de oxidação, uma vez que é um metal de transição, possibilita a redução dos iões nitrato e a formação de alguns complexos octaédricos, como ácidos orgânicos e fosfato inorgânico (Pestana et al., 2014).

A sua biodisponibilidade para as plantas está condicionada pelo solo e seus constituintes minerais, pelo potencial redox deste, pelo pH da solução do solo, pela concentração de reagentes e até pela atividade vegetal e microbiana (Schwertmann, 1991).

Dada a sua importância em toda a biologia vegetal, a carência de Fe na planta provoca inúmeras desvantagens do ponto de vista produtivo, desde menores produções à diminuição de qualidades organolépticas, portanto, a sua indisponibilidade é indesejável no contexto agrícola (Rombolà & Tagliavini, 2006). Atualmente, o combate a este desequilíbrio nutricional é efetuado essencialmente através da aplicação de quelatos sintéticos, quer no solo quer foliarmente (Cesco et al., 2006).

A utilização destes quelatos sintéticos produz um impacto ambiental negativo (contaminações de águas subterrâneas) para além dos seus elevados custos, portanto há a necessidade de obter alternativas (Pestana et al., 2003). Dentro destas possibilidades podem enquadrar-se a escolha de variedades com mecanismos melhorados na captação de Fe, obtidas via melhoramento tradicional de plantas ou organismos geneticamente modificados; a aplicação de matéria orgânica adequada às condições (Lucena, 2006); a aplicação de filtrados bacterianos constituídos por sideróforos (Ferreira et al., 2019) e a utilização da consociação com gramíneas, aproveitando da estratégia redutora desta.

Diversos estudos apontam para que as gramíneas, em condições deficientes em Fe, através da secreção de fitosideróforos para a rizosfera, aumentam a disponibilidade deste nutriente no solo, beneficiando a outra espécie de interesse agronómico, no caso de uma consociação (Cesco et al., 2006; Dai et al., 2018; Dai et al., 2019; Michel et al., 2019; Sadeghzadeh et al., 2021). Deste modo, o aproveitamento desta estratégia em determinados contextos pode representar um caminho alternativo ao uso isolado de quelatos, geralmente recurso único para contrariar a carência de Fe nas culturas, protegendo, assim, o ambiente e beneficiando a própria estrutura económica das explorações agrícolas.

2. Objetivos

Como principal objetivo deste trabalho pretendeu-se estudar a consociação de espécies com diferentes estratégias de combate à carência férrica. Mais especificamente, pretendeu-se avaliar se numa consociação entre uma espécie hortícola (estratégia I) e uma gramínea (estratégia II) em sistema hidropónico, existe um incremento da absorção e assimilação de Fe pela planta hortícola, favorecidos pela estratégia complexante da gramínea.

Foram realizados dois ensaios (I e II) em sistema hidropónico. Em ambos foi possível estabelecer e aperfeiçoar um protocolo de análise de estudo de consociação de espécies, em sistema hidropónico, como objetivo subjacente ao trabalho.

No primeiro ensaio, o objetivo consistiu em avaliar se numa consociação entre uma espécie hortícola (estratégia I) e uma gramínea (estratégia II) em sistema hidropónico, existe um incremento da absorção e assimilação de Fe pela planta hortícola, favorecidos pela estratégia complexante da gramínea.

No segundo ensaio, o objetivo consistiu em avaliar o efeito da aplicação foliar de extratos obtidos a partir ou das raízes ou da parte aérea da gramínea *P. pratensis* no crescimento da *B. oleraceae* submetidas a diferentes concentrações de Fe na solução. Espera-se que os compostos eventualmente presentes em cada um dos extratos de composição química diferente funcionem como um bioestimulante, permitindo a mobilização de Fe (endógeno ou assimilado da solução) atuando na recuperação de situações de carência de Fe, e assim avaliar se na composição destes extratos existe algum metabolito capaz de realizar este processo de mobilização, complementando deste modo os possíveis resultados do ensaio I.

Em ambos os casos, procurou-se clarificar e enquadrar as vias bioquímicas envolvidas na dinâmica particular do Fe, como ponto de partida para aplicar e extrapolar para realidade agronómica (consociação em solo).

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Ferro no solo

A reserva mineral dos solos funciona como fonte primária de nutrientes. No caso do Fe, este está presente sobretudo nos minerais ferromagnesianos (piroxenas, olivinas, anfíbolos e biotite). Através de processos de meteorização dos minerais, este nutriente é libertado na sua forma iónica Fe^{2+} e é rapidamente precipitado na forma de óxidos e hidróxidos, tais como a hematite, sobejando apenas uma pequena percentagem para ser adsorvido no CTC e na matéria orgânica (Pestana, 2000).

A biodisponibilidade do Fe, presente na solução de solo, está muito condicionada pelo solo e seus constituintes minerais, pelo potencial redox deste, pelo pH da própria solução, pelas condições físicas do solo (temperatura, aerificação), pela concentração de reagentes e pela atividade vegetal e microbiana (Schwertmann, 1991).

Tudo isto resulta numa quantidade total de Fe variável entre 0,02 % em solos arenosos até 10 % em solos ferralíticos, todavia o Fe solúvel e conseqüentemente disponível para as plantas apresenta valores muito inferiores quando comparados à totalidade (Chen & Barak, 1982).

3.2 Dinâmica do Fe na planta e transporte raiz - parte aérea

Tal como já foi referenciado, o Fe participa em inúmeros processos metabólicos cruciais para sobrevivência das plantas, contudo este elemento apresenta uma baixa mobilidade dentro da planta, sendo fulcral o conhecimento de toda sua cadeia de transporte após absorção radicular (Figura 3.1). Particularmente nas dicotiledóneas, o enzima Quelato de Fe(III)-redutase (QFR) EC. 1.16.1.7, que diminui a sua atividade em pH superior a 6,5, reduz este elemento na membrana plasmática a Fe(II). Já no simplasto do sistema radicular, este sofre oxidação e forma um complexo Fe(III)-citrato, sendo transportado nesta forma ao longo do xilema até à parte aérea. Aqui o Fe libertado é novamente reduzido e por fim, o Fe(II) é novamente complexado pela nicotianamina no citoplasma, onde é distribuído para participar nos variados processos metabólicos (Pestana et al., 2003; Pestana, 2000).

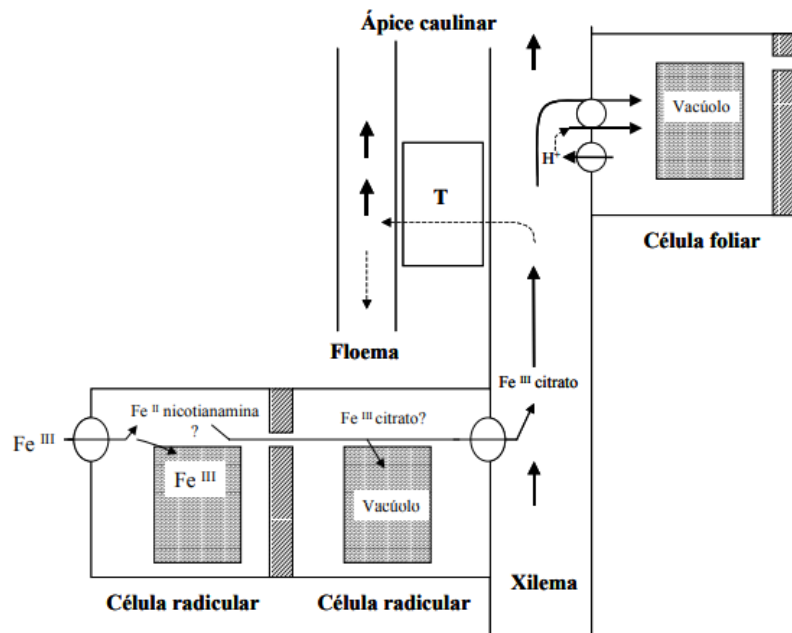


Figura 3.1 Modelo descritivo do transporte em dicotiledóneas do nutriente ferro, desde a parte radicular até à parte aérea. O Fe^{3+} é reduzido na membrana plasmática a Fe^{2+} . Já no simplasto do sistema radicular, este sofre oxidação e forma um complexo Fe(III)-citrato , sendo transportado nesta forma ao longo do xilema até à parte aérea. Fonte: Pestana (2000)

3.3 Estratégia redutora e complexante

As plantas quando sujeitas à deficiência de Fe podem ser reunidas em dois grupos (Figura 3.2) (Pestana et al., 2014):

- Estratégia I ou estratégia redutora, presente na maior parte das espécies agrícolas, em que se verifica o aumento da atividade da QFR e a excreção de compostos fenólicos a nível radicular na tentativa de acidificação do meio envolvente;
- Estratégia II ou complexante, a qual inclui as plantas gramíneas.

As plantas agrupadas na estratégia I libertam prótons, de forma a acidificar a rizosfera (efeito residual em solos calcários) e aumentam a atividade do enzima QFR, estimulando a formação generalizada de ápices secundários curtos para que seja mais provável a entrada de ferro na planta (Bocchini et al., 2015).

Já as gramíneas, plantas de estratégia II, respondem a baixos níveis de Fe na solução de solo libertando fitosideróforos, compostos muito estáveis e com elevada afinidade para o Fe mesmo em formas insolúveis e em meios alcalinos, como são os solos de origem calcária. Estes solubilizam o Fe e formam complexos que depois são absorvidos pela planta. Em solos calcários, as plantas da estratégia II têm maior capacidade de captação de Fe, visto os seus mecanismos de resposta à carência de Fe não estarem tão dependentes do pH e da concentração de bicarbonatos, ao contrário das plantas de estratégia I. Estes complexos de fitosideróforos com Fe(III) podem ser imobilizados por dicotiledóneas, (Bocchini et al., 2015; Cesco et al., 2006). Apesar da adsorção de Fe por parte fitosideróforos ser afetada por pH elevado, a estratégia I é a mais condicionada por este fator em comparação com a estratégia II, dada as condições não-redutoras do Fe^{3+} nestas condições, revelando assim que as dicotiledóneas são mais sensíveis à carência férrica que as gramíneas (Tsai & Schmidt, 2017).

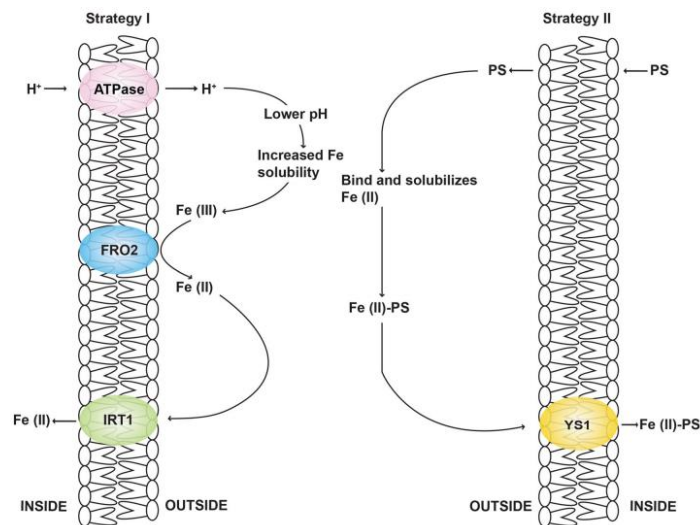
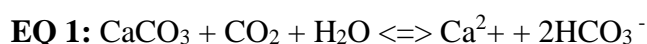


Figura 3.2 Representação da estratégia I (esquerda), definida pelo incremento da ação do enzima QFR que reduz o Fe^{3+} a Fe^{2+} e ainda com a libertação de prótons para rizosfera, na tentativa de a acidificar; e da estratégia II (direita), com a libertação de exsudados radiculares, incluindo fitosideróforos, que complexam o Fe^{2+} , presentes na rizosfera e de seguida entram na raiz por transportadores específicos. Fonte: Dey et al. (2020)

3.4 Clorose férrica e implicações agronómicas

A combinação de determinados contextos desfavoráveis sobretudo nos fatores inerentes à biodisponibilidade de Fe no solo, resultam em dificuldades acrescidas à solubilização de óxidos férricos e conseqüentemente à deficiente assimilação do Fe iónico a partir da solução de solo, levando a que as plantas apresentem deficiência neste elemento, processo conhecido como clorose férrica (Pestana et al., 2014).

Na região mediterrânica, a clorose férrica é causada pela diminuta quantidade de Fe disponível no solo, consequência da rápida formação de óxidos de Fe muito pouco solúveis e sobretudo pela ação do ião bicarbonato, abundante em solos calcários, resultante da dissolução do carbonato de cálcio (Equação 1) (Pestana et al., 2003).



Este, dado o seu elevado poder tampão, anula os protões e algumas enzimas necessárias à solubilização dos óxidos férricos (Equação 2), impedindo assim, a assimilação de Fe^{3+} nas plantas (Pestana et al., 2014; Römheld & Marschner, 1986).



A clorose férrica evidencia-se nas folhas mais jovens, dada a baixa mobilidade do Fe na planta, com um amarelecimento do limbo à exceção das nervuras que permanecem esverdeadas (Figura 3.3), resultado de uma diminuição das clorofilas e um aumento relativo dos carotenoides (Abadía, 1992). Ao nível radicular, a resposta à clorose férrica nas dicotiledóneas, inicia-se com um incremento da lateralização e formação de raízes secundárias, posteriormente ocorre um aumento do diâmetro das raízes e por fim uma subida da atividade do enzima QFR (Jiménez et al., 2019).



Figura 3.3 Sintomas típicos de carência de Fe, com o amarelecimento do limbo das folhas novas à exceção das nervuras que permanecem verdes, em diferentes espécies (da esquerda para direita: morangueiro, alfarrobeira, porta-enxerto de citrinos). Fonte: “O ferro, novos desafios para uma produção agrícola sustentável”, de Pestana & Correia (2019) (disponível em <https://vozdocampo.pt/2020/08/13/o-ferro-novos-desafios-para-uma-producao-agricola-sustentavel/>, acessado em 18 de janeiro de 2021)

Nas culturas frutícolas e hortícolas, esta deficiência conduz a uma redução do vigor das plantas, a perda de qualidade do fruto e a uma diminuição da produção total, quer pelo menor número de frutos produzidos, quer pela diminuição do calibre dos próprios frutos, evidenciando o papel do Fe em alguns dos mais importantes processos metabólicos vegetais, como a fotossíntese e a respiração (Rombolà & Tagliavini, 2006). A clorose férrica também afeta a eficiência do fotossistema II, comprometendo deste modo a fase fotoquímica da fotossíntese, e especificamente em estados cloróticos mais avançados este efeito é irreversível (Morales et al., 1991).

A perda de produção devido a clorose férrica está bem documentada em inúmeras culturas, especialmente em contexto de solos calcários. Particularmente, os citrinos e a soja são altamente suscetíveis à carência de Fe, seguidos das prunóideas, das uvas, dos kiwis e dos mirtilos (Rombolà & Tagliavini, 2006; Vose, 1982).

Inclusive, ao nível da deterioração da qualidade de fruto, estão identificadas inúmeras correlações com a clorose férrica, tais como diminuição de calibre, perda de firmeza e o desequilíbrio de fenóis e ácidos orgânicos (Michel et al., 2019; Rombolà & Tagliavini, 2006).

3.4 Correção da clorose férrica

Face a este *stress* nutritivo existem diversas soluções preventivas/minorativas tais como escolha de porta-enxertos e/ou de genótipos tolerantes à clorose férrica, enriquecimento dos solos com matéria orgânica, especialmente de estrume de bovino, como estimulante de crescimento radicular e de atividade microbiana, esta melhora ainda a estrutura do solo, estimulando assim a troca gasosa do solo, reduzindo a acumulação de CO₂ e assim diminuindo a formação de bicarbonatos (Lucena, 2003). Existem ainda outras alternativas com pouca expressividade derivada das suas limitações, como a aplicação de sangue dessecado ou a injeção de Fe no tronco (Rombolà & Tagliavini, 2006). Atualmente existem desenvolvimentos científicos no sentido da utilização de filtrados bacterianos compostos por sideróforos (Ferreira et al., 2019) e também da utilização de análogos sintéticos de ácidos mugineicos (Suzuki et al., 2021).

O combate à clorose férrica é efetuado maioritariamente pela aplicação de quelatos de Fe ao solo ou foliarmente. Estas aplicações acarretam diversas desvantagens, tais como os elevados custos, os efeitos temporários de alguns compostos instáveis (citrato de Fe, Fe-EDTA, Fe-HEDTA), com pouca viabilidade em solo calcário e os perigos ambientais e sanitários devido à lixiviação dos compostos mais estáveis (Fe-EDDHA, Fe-EDDHMA) (Cesco et al., 2006).

Com o objetivo de procurar de novas alternativas mais sustentáveis surge a consociação com gramíneas (Rombolà & Tagliavini, 2006). A consociação de plantas é uma prática agrícola que envolve duas ou mais espécies, a crescer e coexistir no mesmo espaço, onde uma das espécies vegetais é dominante. Esta técnica já antiga e ainda com alguma expressão na agricultura de subsistência, está colocada atualmente, à margem da agricultura moderna, apesar das grandes potencialidades nos diversos campos agronómicos e ecológicos (Brooker et al., 2015; Dai et al., 2018).

As gramíneas, que muitas vezes são denominadas como inimigas das culturas no contexto de uma exploração, podem tornar-se auxiliares neste controlo da clorose férrica, dada a sua estratégia intrínseca de combate à carência de Fe que pode ser aproveitado pelas culturas, poupando, desta forma, investimentos em herbicidas e em quantidades

superiores de quelatos sintéticos, em mão-de-obra com desmatagens e respectivos subsídios energéticos.

Diversos estudos desenvolveram ensaios em vaso e em hidroponia, de consociações onde os fitosideróforos libertados pelas gramíneas facilitavam a captação de Fe (Cesco et al., 2006; Dai et al., 2018, 2019; Michel et al., 2019; Sadeghzadeh et al., 2021).

Em casos de consociação entre uma dicotiledónea e uma gramínea, existem indicadores de que as plantas de estratégia I se aproveitam da estratégia complexante das gramíneas, melhorando assim a sua nutrição férrica. A libertação de fitosideróforos por parte da gramínea aumentam a disponibilidade de Fe na solução de solo, facilitando a absorção deste e diminuindo ou atrasando os efeitos da clorose férrica na dicotiledónea.

3.5 Caracterização dos fitosideróforos

Os fitosideróforos são aminoácidos secundários de baixa massa molecular que funcionam como quelantes naturais, complexando o Fe e outros metais como Mn, Zn e o Cu, disponibilizando-os à planta via transportadores específicos (Conte & Walker, 2011; Curie et al., 2001; Dey et al., 2020).

Estes estão agrupados em diferentes famílias como os ácidos mugineicos, os ácidos avénicos, os ácidos disticónicos e as nicotianaminas (Kratena et al., 2021) e começam a ser libertados a um ritmo constante após iniciar-se o fotoperíodo (Römheld & Marschner, 1986).

Os ácidos mugineicos são os fitosideróforos com maior expressão em situações de carência de Fe, estes têm como precursor a nicotianamina que resulta da condensação de 3 moléculas S-adenosil-metionina (Conte & Walker, 2011). Assim a nicotianamina, para além de estar intimamente ligada à translocação do Fe na planta, é também um importante precursor para formação dos ácidos mugineicos (Figura 3.4), essenciais à estratégia complexante das gramíneas (Takahashi et al., 2003; Yoneyama, 2021).

A libertação de fitosideróforos parece estar diretamente correlacionada com a concentração de Fe nas plantas, sendo regulada por “sensores” localizados nas folhas e

nas raízes que consoante a presença ou ausência de Fe, ativam ou desativam a biossíntese destes compostos e a sua libertação (Mimmo et al., 2014; Schmidt, 2003).

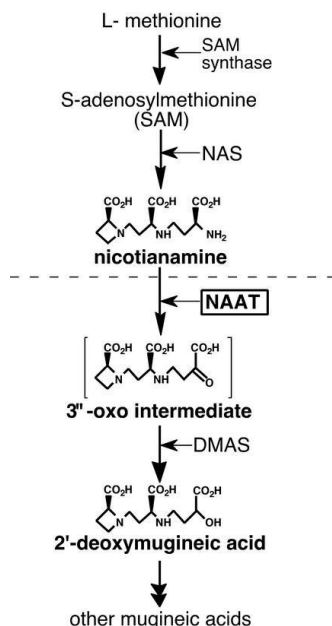


Figura 3.4 Processo de biossíntese dos ácidos mugineicos, uma das famílias de fitosideróforos com maior relevância, onde é evidenciado a importância da nicotianamina na formação destes aminoácidos. Fonte: Takahashi et al. (2003)

3.6 Bioestimulantes

Cada vez são mais notórias as dificuldades em aumentar as produtividades face ao aumento da população mundial e consequente consumo de produtos agrícolas, ainda mais com a diminuição de terra arável para cultivo e com a aproximação aos limites máximos de potencial genético das culturas (Povero et al., 2016). Existe, portanto, urgência em produzir mais com menos, aumentando as produtividades sem comprometer o ambiente, assim os bioestimulantes podem desempenhar um papel crucial nesta matéria (Carvalho & Vasconcelos, 2013).

Os bioestimulantes são produtos que contêm substâncias e/ou microorganismos que estimulam os processos naturais nutricionais das plantas, desenvolvendo inúmeros benefícios tais como um aumento da absorção de nutrientes e da sua eficácia, uma maior tolerância a *stress* variados, uma quebra de dormência, um incremento da atividade

fotossintética e suas consequências e um aumento da qualidade e da produtividade da cultura (Ricci et al., 2019). Estes podem ter diferentes origens desde compostos resultantes da atividade agro-industrial, a substâncias húmicas, a culturas microbianas, a extratos de algas (Ferreira et al., 2019; Parađiković et al., 2019; Saavedra et al., 2020).

Assim, bioestimulantes com diferentes composições podem explorar vias bioquímicas vegetais completamente diferentes e alternativas a processos já existentes, representando soluções viáveis ao procedimento convencional (Parađiković et al., 2019; Van Oosten et al., 2017).

4. Material e Métodos

4.1 Ensaio I

Este ensaio foi realizado na estufa de vidro localizada no Horto da Universidade do Algarve, no *campus* de Gambelas, desde 12 de novembro de 2020 até 18 de dezembro de 2020. De modo a cumprir os objetivos definidos, para hortícola utilizaram-se plantas de couve-brócolos (*Brassica oleraceae* var. *italica* Plenck), provenientes de viveiro, e para a gramínea utilizou-se uma espécie da família Poaceae, cabelo-de-cão-de-colmo-liso (*Poa pratensis* L.). Estas plantas foram obtidas por sementeira em vermiculite, sendo regadas com solução de Hoagland a meia força, após a sua germinação.

De seguida, quando as gramíneas apresentavam cerca de 5 cm de altura média foram transferidas em conjunto com a hortícola, na proporção de 4 alvéolos da gramínea para 1 alvéolo da hortícola (modalidades de *intercropping*), para um copo com orifícios localizado em caixas de plástico opacas de 12 L (Figura 4.1), em regime hidropónico com solução de Hoagland e com diferentes concentrações de Fe, estabelecendo-se seis modalidades apresentadas na tabela 4.1.

Tabela 4.1 Descrição das seis modalidades constituintes do ensaio I.

Tratamento de Fe	Consociação	Modalidade
Fe0	<i>B. oleraceae</i> (controlo)	MC-Fe0
	<i>P. pratensis</i> + <i>B. oleraceae</i>	IC-Fe0
Fe1	<i>B. oleraceae</i> (controlo)	MC-Fe1
	<i>P. pratensis</i> + <i>B. oleraceae</i>	IC-Fe1
Fe5	<i>B. oleraceae</i> (controlo)	MC-Fe5
	<i>P. pratensis</i> + <i>B. oleraceae</i>	IC-Fe5

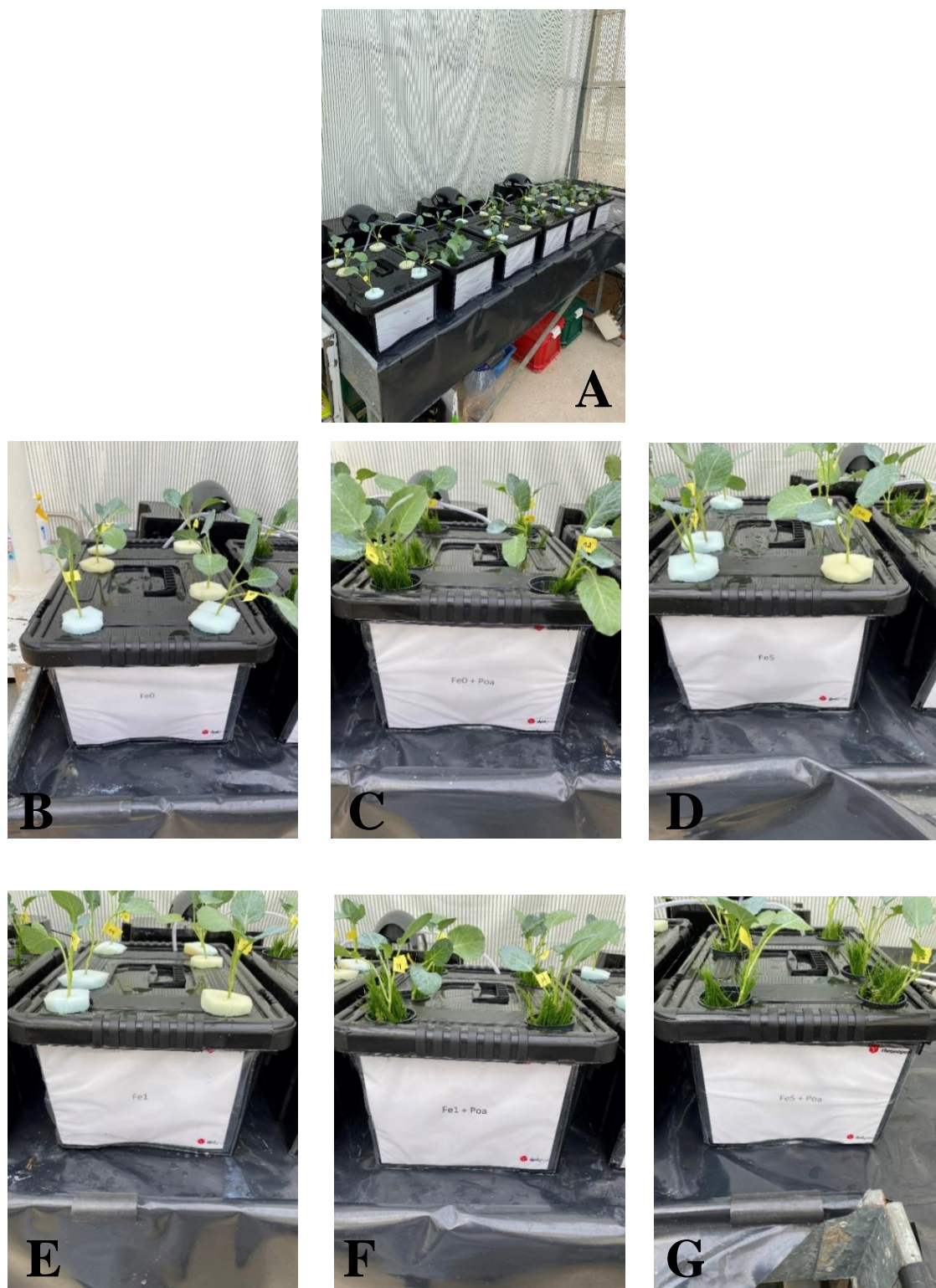


Figura 4.1 A- Disposição do ensaio I na estufa de vidro, no dia 12 de novembro de 2020 (data de início do ensaio). Cada caixa é representativa de uma modalidade, sendo que cada uma destas apresenta 6 repetições. Cada conjunto de duas caixas é apoiado por uma bomba de água que assegura o arejamento da solução; **B** – modalidade MC-Fe0; **C** – modalidade IC-Fe0; **D** – modalidade MC-Fe5; **E** – modalidade MC-Fe1; **F** – modalidade IC-Fe1; **G** – modalidade IC-Fe5.

Cada caixa representativa de cada uma das modalidades apresentava 6 repetições de cada tratamento. Nas modalidades de *monocropping*, o suporte da *B. oleraceae* era efetuado através de um pedaço de esponja, enquanto nas modalidades de *intercropping* este era assegurado por um copo com fendas que permitia o desenvolvimento radicular (Figura 4.2). Em ambos os casos, as raízes estavam submersas na solução nutritiva presente na caixa.

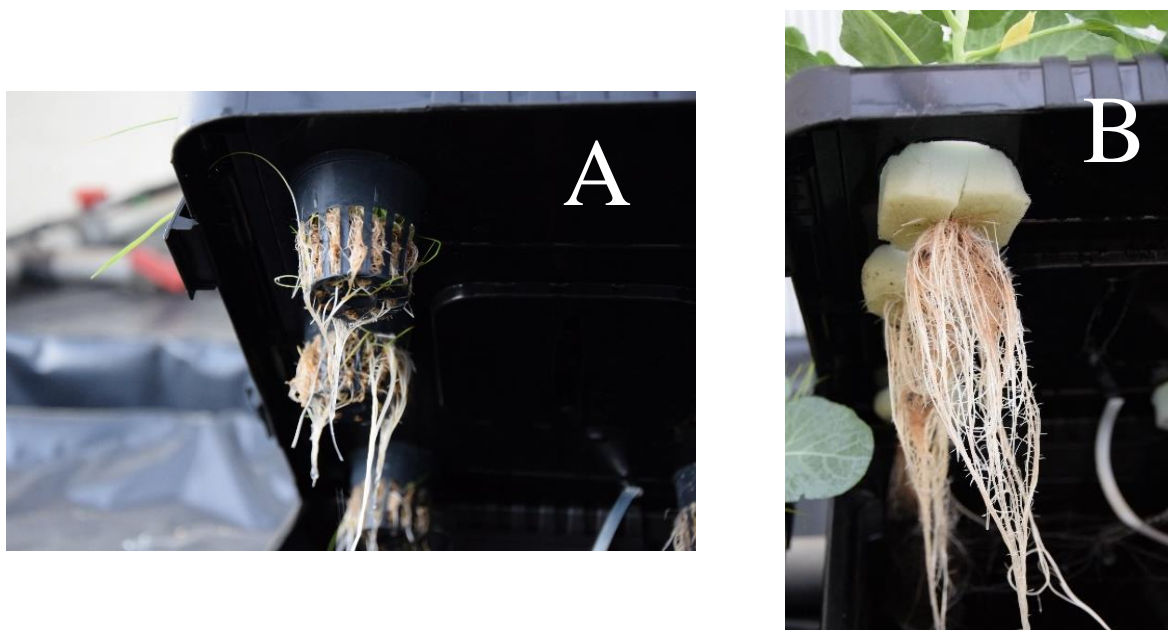


Figura 4.2 Estrutura de suporte das plantas utilizada no ensaio I, em hidroponia: **A** – copo de suporte com fendas para as modalidades de *intercropping*; **B** – círculo de esponja para suporte para modalidades de *monocropping*.

A solução nutritiva utilizada neste ensaio foi a de Hoagland, realizada com água desmineralizada e com as seguintes concentrações de macronutrientes (mM): 5,0 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 5,0 KNO_3 , 1,0 KH_2PO_4 , 2,0 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, e micronutrientes (μM): 46,0 H_3BO_3 , 0,8 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,4 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 9,0 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e 0,02 MoO_3 . Nas modalidades com Fe (Fe1 e Fe5), este foi adicionado na forma Fe-EDDHMA em duas concentrações (ml/l) 0,1 e 0,5, respetivamente. Após a preparação da solução nutritiva acertou-se os valores de pH para próximo de 6,0 utilizando NaOH (1 N).

O arejamento destas soluções nutritivas foi garantido por bombas de aquário ligadas a um sistema de tubagens, regulado por torneiras de forma a garantir um fluxo de ar adequado ao nível radicular. Estes sistemas não foram partilhados por modalidades

com diferentes tratamentos de ferro, a fim de não ocorrerem contaminações. A monitorização da solução nutritiva foi efetuada através de medições de pH e da condutividade elétrica (CE), para efetuar possíveis substituições de solução, caso os valores de CE diminuíssem abaixo de 0,2 dS/m, comparativamente ao valor inicial.

Durante a realização do ensaio foi efetuada uma monitorização quase diária, a fim de verificar o correto funcionamento dos sistemas de oxigenação e o desenvolvimento dos parâmetros acima referidos da solução nutritiva (leituras do pH e da CE da solução nutritiva).

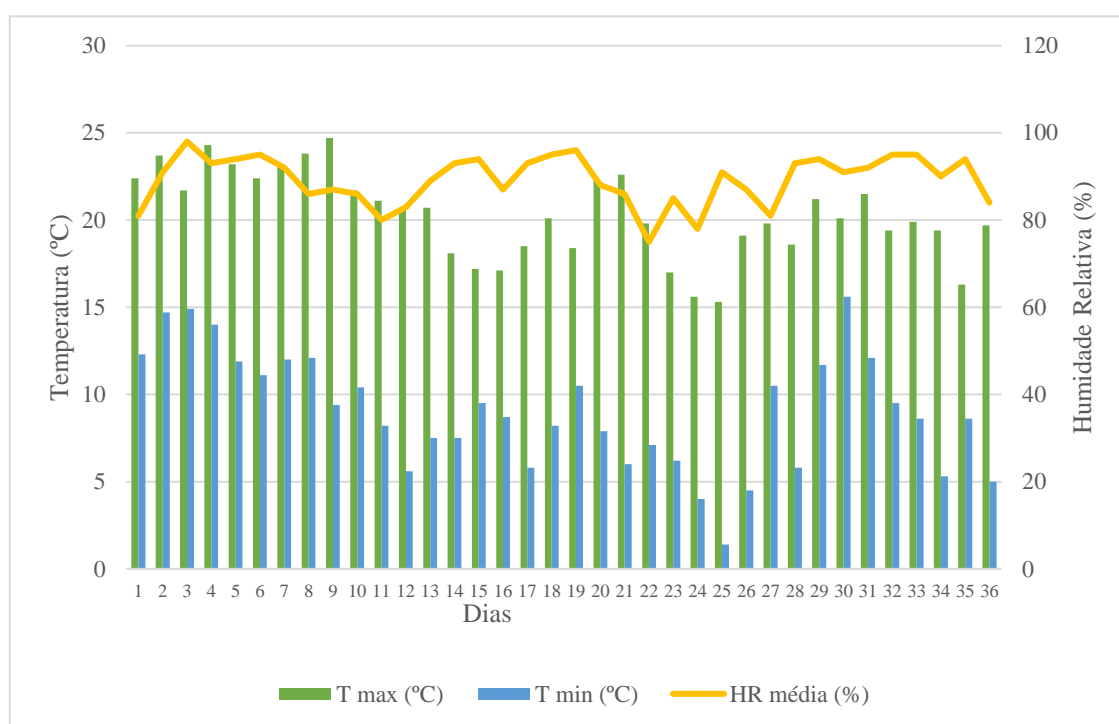


Gráfico 4.1 Registo das temperaturas máximas e mínimas, e da humidade relativa média durante o ensaio I, correspondente ao período de 12/11/2020 a 18/12/2020, registadas na estação meteorológica automática do Patacão. Fonte: Serviço de Agrometeorologia – DRAP Algarve

O grau de clorose das folhas foi estimado 3 vezes por semana, de modo não destrutivo através da utilização de um aparelho medidor de clorofila SPAD-502 (Minolta Co., Japão). Os valores obtidos foram posteriormente convertidos em concentração foliar de clorofila total ($\mu\text{mol.m}^{-2}$) utilizando uma curva de calibração da clorofila, previamente estabelecida, analisando os discos foliares que apresentavam diferentes graus de

deficiência de Fe. A clorofila foi extraída com 100% de acetona na presença de ascorbato de sódio (Abadia & Abadia, 1993), de seguida mediu-se através de espectrofotometria a clorofila (Lichtenthaler, 1987), obtendo-se, por fim, a seguinte equação: $CHL = (0,0831 * (SPAD)^2) + (10,04 * (SPAD)) + 67,442 / (R^2 = 0,953; n=28; p<0.001)$.

No final do ensaio, em laboratório à temperatura de 25 ± 2 °C, foram realizados protocolos e métodos já estabelecidos e otimizados, com os seguintes objetivos: I – avaliação da biomassa da *B. oleraceae*; II - determinação da atividade da quelato de Fe(III)-redutase em *B. oleraceae*; III – determinação da fluorescência da clorofila *a*

I – Avaliação da Biomassa da *B. oleraceae*

No final do ensaio, as amostras dos diferentes órgãos vegetais colhidos (folhas, caule e raiz) para análise foram lavadas para remover qualquer contaminação superficial, primeiro com detergente não iónico (0,1 %), depois com 0,01 M de HCl, posteriormente com água corrente e, por último, enxaguado três vezes com água desionizada.

O peso fresco (PF) foi registado para cada amostra e posteriormente as amostras foram colocadas a secar a 60 °C até peso constante, de forma a ser possível registar o peso seco (PS).

Com os valores do peso seco da parte aérea e da parte radicular determinou-se a razão entre a parte radicular e a aérea (R/A) usando o seguinte cálculo: $R/A = PS \text{ parte radicular} / PS \text{ parte aérea}$.

II – Determinação da atividade da quelato de Fe(III)-redutase (QFR) em *B. oleraceae*

A determinação da atividade do enzima QFR (EC. 1.16.1.7) foi calculada em ápices radiculares, no final do ensaio. Utilizou-se um método modificado a partir original de Bienfait (Bienfait et al., 1983). Este método baseia-se na quantificação colorimétrica do complexo Fe(II)-BPDS (dissulfonato de batofenantrolina) resultante da redução do Fe adicionado na forma de quelato de Fe(III)-EDTA (ácido etileno diamino tetra-acético). Na medição da atividade dos ápices radiculares, cortaram-se ápices com 2 cm de comprimento com um bisturi. As reações ocorreram num tubo Eppendorf de 1,5 mL de capacidade contendo a seguinte composição: 900 µL de solução de Hoagland a meia força e sem micronutrientes, 300 µL de BPDS, 30 µL de Fe(III)-EDTA e 300 µL de solução tampão MES (ácido 2-(N- morfolino)etanossulfónico; pH = 6,0). O tempo de reação no escuro foi ajustado aos diferentes órgãos vegetais analisados: 1 h para ápices radiculares.

Em paralelo, foram efetuadas sempre soluções de controlo (sem material vegetal) de modo a corrigir possíveis reduções não específicas do Fe. Após este período procedeu-se à leitura da absorvância das amostras a 535 nm num espectrofotómetro UV-Visível. Para os cálculos considerou-se um fator de extinção de 22,14 mM.cm⁻¹. Os resultados expressam-se em nmol de Fe(II).min⁻¹.g⁻¹ de peso fresco (PF).

III – Determinação da fluorescência da clorofila *a* em *B. oleraceae*

Alguns parâmetros da fluorescência da clorofila particularmente a eficiência do fotossistema II (Fv/Fm) e a fluorescência basal (Fo) foram obtidos através de um fluorímetro portátil (Hansatech, Inglaterra) na folha mais nova totalmente desenvolvida, foram realizadas 6 medições para cada modalidade no final do ensaio. Através de umas molas próprias para medição, realizou-se uma adaptação ao escuro durante 20 minutos e de seguida as folhas foram iluminadas, por fim obteve-se as leituras dos seguintes parâmetros: fluorescência basal (Fo), fluorescência máxima (Fm), fluorescência variável (Fv) e eficiência do fotossistema II (Fv/Fm).

4.2 Ensaio II

Este 2º ensaio foi realizado na estufa nº6, localizada no horto da Universidade do Algarve, no campus das Gambelas, durante o período de 20 de maio de 2021 até 5 de junho de 2021. Ainda no sentido de atingir o objetivo proposto, foi realizada uma sementeira de *Poa pratensis* L. (nome comum: cabelo-de-cão-de-colmo-liso) em vermiculite, regada com solução de Hoagland a meia força após germinação (Figura 4.3). Seguidamente, após a gramínea apresentar uma altura média de 15 cm iniciou-se o processo de preparação dos dois extratos da *P. pratensis*, um extrato foliar e um extrato radicular.

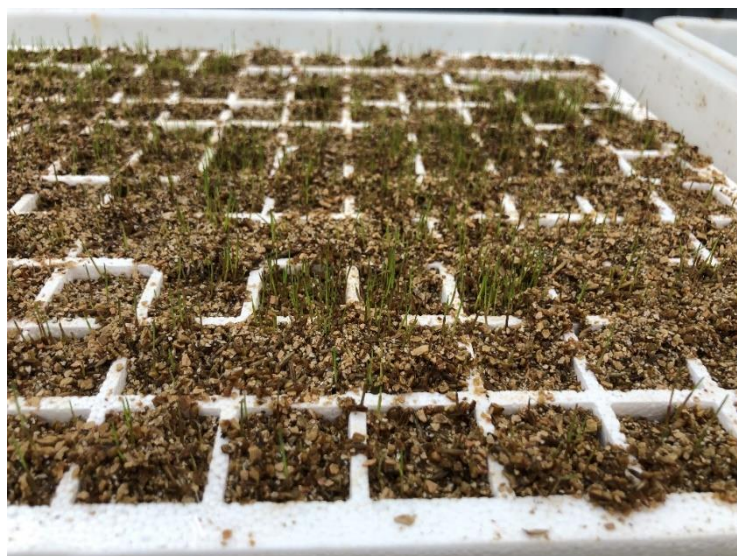


Figura 4.3 Fotografia pós-germinação da *P. pratensis* em vermiculite, nos alvéolos.

Este processo de preparação iniciou-se com uma pré-lavagem das plantas para remoção da vermiculite e de outros resíduos, depois foi separada a parte aérea, da parte radicular. De seguida, foi pesada respetivamente 100 g da parte aérea e da parte radicular, e foram adicionadas a cada uma destas 1000 ml de água desionizada, seguidamente, estas duas misturas foram cada uma triturada recorrendo a uma trituradora. Os triturados passaram primeiro por um crivo de 0,2 mm, depois por um pano fino para eliminar resíduos e por fim foi realizado uma filtragem em vácuo. Por fim, as duas modalidades de extratos foram congeladas a -20 °C, constituindo assim dois extratos diferentes, um extrato foliar e outro extrato radicular (Figura 4.4).

O sistema hidropónico foi similar ao do primeiro ensaio. Utilizaram-se sete caixas de plástico opaco de 12 L, cada uma com 6 plantas de couve-brócolos (*Brassica oleraceae* L. var. *italica*) constituindo 6 repetições para as 7 modalidades distintas, tal como apresenta-se na tabela 4.3. Foi necessária, ainda, a colocação de papel de alumínio nas caixas, em resposta às temperaturas registadas naquele período (gráfico 4.2), de modo a atenuar as elevadas temperaturas no interior da estufa e assim evitar ao máximo o aquecimento da solução nutritiva.



Figura 4.4 Resultado final do processo de produção dos extratos: à esquerda, o extrato foliar e à direita, o extrato radicular.

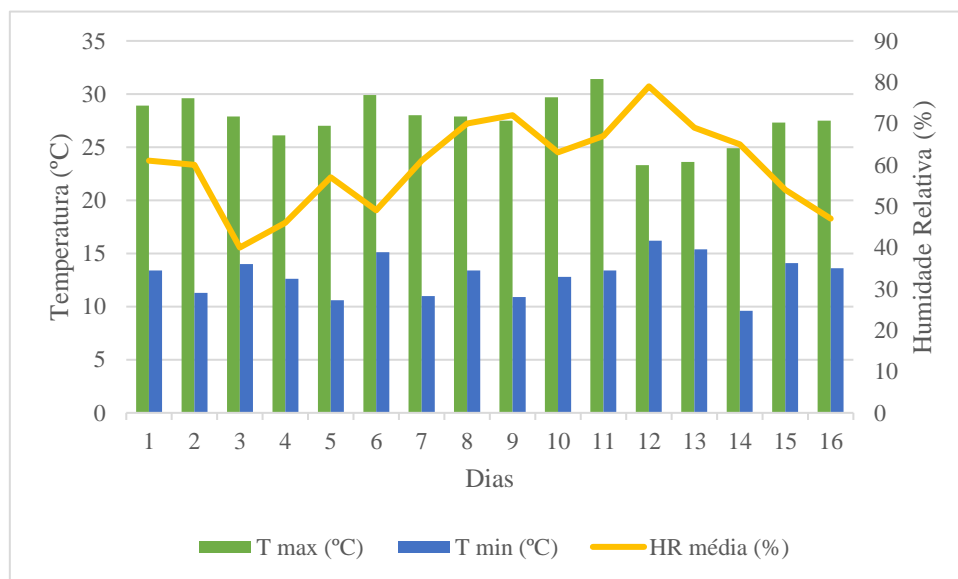


Gráfico 4.2 Registo das temperaturas máximas e mínimas, e da humidade relativa média durante o ensaio II, correspondente ao período de 20/5/2021 a 5/6/2021, registadas na estação meteorológica automática do Patacão. Fonte: Serviço de Agrometeorologia – DRAP Algarve

Após o estabelecimento da cultura no sistema hidropónico, ao fim do sexto dia com o aparecimento dos primeiros sintomas de clorose férrica, iniciou-se as leituras de SPAD intervaladas com as pulverizações com os respetivos extratos, tal como está indicado na tabela 4.4. Estas pulverizações eram efetuadas sempre de manhã no total de

5 ml de extrato por planta, 30 ml de extrato por caixa, anterior a estas era adicionado um molhante *Genapol*, na concentração de 0,5 ml/l. Estas aplicações foram repetidas 4 vezes, perfazendo um total de 20 ml do respectivo extrato por planta, no total do ensaio.

Tabela 4.2 Modalidades e respetiva designação do ensaio II

Modalidade	Designação
Fe0	Fe0
Fe0 + Pulverização com extrato foliar	Fe0+PEF
Fe0 + Pulverização com extrato radicular	Fe0+PER
Fe1	Fe1
Fe1 + Pulverização com extrato foliar	Fe1+PEF
Fe1 + Pulverização com extrato radicular	Fe1+PER
Fe10	Fe10

Tabela 4.3 Programação diária das pulverizações com os extratos e medições de SPAD

Dias	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Leitura SPAD	X			X		X		X		X		X		X	X	X
Pulverização							X				X				X	X

Como solução nutritiva base foi novamente usada a de Hoagland com as concentrações já descritas acima para as modalidades correspondentes, com uma única diferença na modalidade Fe10 que apresentava uma concentração de Fe-EDDHMA de 1 ml/l. Seguiu-se o mesmo procedimento adotado no Ensaio I, com o acerto dos valores de pH próximo de 6,0. O sistema de arejamento foi idêntico ao utilizado no Ensaio I.

A monitorização da solução nutritiva foi, igualmente, efetuada através de medições de pH e da condutividade elétrica, para efetuar possíveis substituições de solução, caso os valores de CE diminuam 0,2 dS/m, comparativamente ao valor inicial.

Tal como procedido no ensaio I, foi necessária uma monitorização diária para verificar o correto funcionamento dos sistemas de arejamento e a não degradação da solução nutritiva, através de leituras do pH e da CE. Neste contexto, foi ainda necessário o registo do SPAD da parte aérea da hortícola e também a realização do tratamento com os extratos correspondentes às modalidades, nos intervalos de tempo programados.

De modo a interpretar a possível ação bioestimulante dos extratos, realizou-se a análise destes extratos quanto à capacidade quelante de Fe (II), ao teor de fenóis totais e à proteína solúvel. Para cada extrato e cada factor executou-se 5 repetições.

A capacidade quelante de Fe (II) foi calculada através do método de Carter (Carter, 1971). Os extratos (100 ml) foram incubados separadamente no escuro com 100 ml de FeCl₂ (2 mM) e 3,7 ml de metanol a pH 4,75. Seguidamente, foram adicionados 100 ml de ferrozine (5 mM) e a absorvância foi lida (562 nm) após a mistura ter atingido o equilíbrio (10 min à temperatura ambiente, 25 ± 2 °C). A percentagem de inibição da formação do complexo ferrozine-Fe (II) foi calculada utilizando a equação: Inibição (%) = [1 - (AExt / A0)] 100, onde A0 representa a absorvância do controlo e AExt a absorvância na presença do extrato.

O total de compostos fenólicos foi determinado de acordo com o método de Folin-Ciocalteu (Vernon & Rudolf, 1999). Soluções dos extratos (0,5 ml) foram misturadas com uma diluição de dez vezes do reagente Folin-Ciocalteu (2,5 ml) e incubadas por 2 min à temperatura ambiente (25 ± 2 °C), antes da adição de carbonato de Na (2 ml, 7,5% p / v). A absorvância da solução foi medida em 765 nm após repouso de 30 min à temperatura ambiente (25 ± 2 °C). O resultado foi expresso como equivalentes de ácido gálico (GAE= mg de ácido gálico/litro de extrato).

A proteína solúvel total foi calculada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), usando BSA como padrão. Os resultados foram expressos em µg por ml de proteína desnaturada em solução.

No final do ensaio à semelhança do já realizado em I, em laboratório à temperatura ambiente (25 ± 2 °C), foram realizados protocolos e métodos já estabelecidos e otimizados, com os seguintes objetivos: I – avaliação da biomassa; II – quantificação da clorofila total. Todos estes métodos e protocolos já foram acima descritos no Ensaio I.

4.3 Análise Estatística

Todos os dados recolhidos ao longo do ensaio foram analisados estatisticamente no programa *R* versão 4.1.0. Para os diferentes dados foram efetuadas exclusivamente análises de variância simples (One-way Anova), com uma variável independente (modalidades) sobre uma variável dependente (concentração de clorofila total; atividade da QFR; volume da raiz; pf raiz; ps raiz; n° de folhas total; n° de folhas novas; n° de folhas velhas; pf folhas novas, pf folhas velhas; ps folhas novas; ps folhas velhas; altura; pf caule; ps caule; diâmetro caule; PR/PA; eficiência do fotossistema II; fluorescência basal), e ainda uma comparação das médias pelo teste de Tukey, com intervalo de significância de 95%.

5. Resultados e Discussão

5.1 Ensaio I

5.1.1 Clorofila nas folhas novas na *B. oleraceae* L.

Dada a baixa mobilidade do Fe na planta, o primeiro sintoma de clorose férrica surge nas folhas novas (Abadia, 1992). No gráfico 5.1 podemos verificar uma diminuição do valor de clorofila ao longo do tempo, confirmando assim, a importância do Fe na síntese da clorofila (Broadley et al., 2011; Pestana et al., 2014), visto que todos os outros parâmetros nutricionais são assegurados pela solução nutritiva.

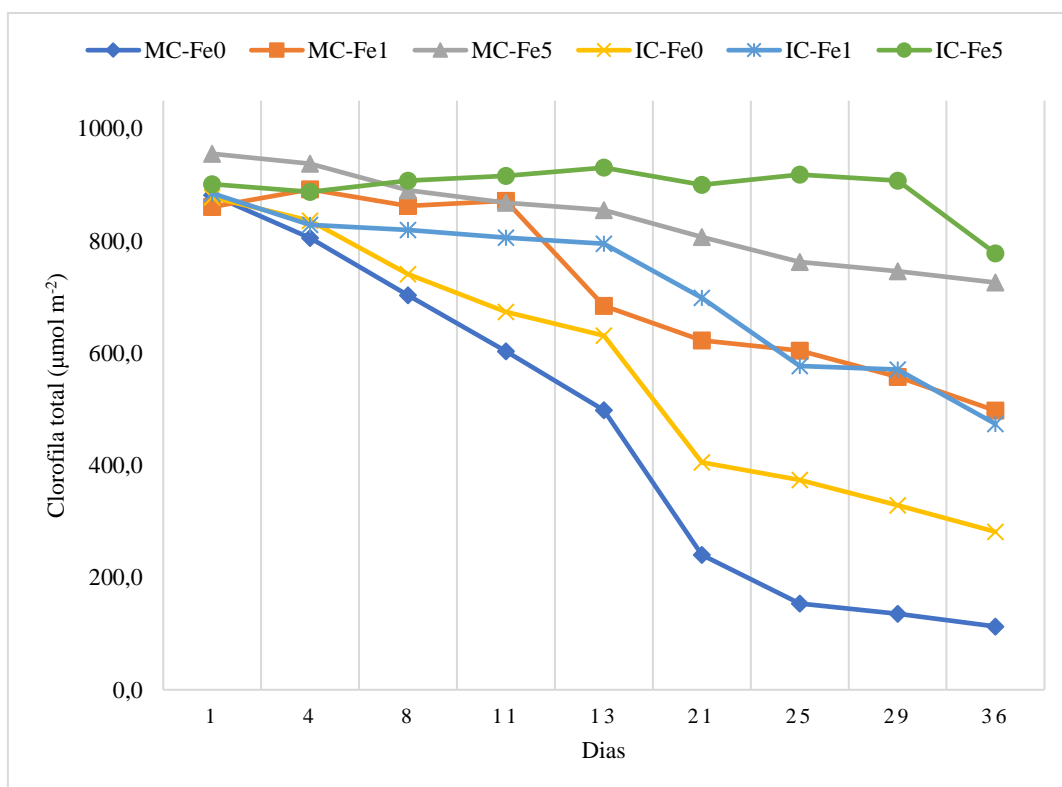


Gráfico 5.1 Evolução temporal dos valores médios da concentração de clorofila total ($\mu\text{mol.m}^{-2}$) nas folhas novas da hortícola *B. oleraceae*, para cada uma das 6 modalidades testadas, ao longo da duração do ensaio I.

Tabela 5.1 Concentração da clorofila total nas folhas novas da *B. oleraceae* ($\mu\text{mol.m}^{-2}$) ao longo da duração do ensaio I. Os resultados são valores médios \pm desvio padrão. Os valores representados pelas mesmas letras não apresentam diferenças significativas ($p>0,05$; teste de Tukey).

Modalidades	Média Clorofila Total ($\mu\text{mol.m}^{-2}$)										
	1	4	8	11	13	21	25	29	36		
MC-Fe0	881,9 \pm 93,1 <i>ab</i>	805,5 \pm 92,9 <i>a</i>	703,4 \pm 112,5 <i>a</i>	603,3 \pm 69,3 <i>a</i>	498,3 \pm 100,2 <i>a</i>	240,7 \pm 107,5 <i>a</i>	153,8 \pm 98,0 <i>a</i>	135,7 \pm 86,5 <i>a</i>	112,9 \pm 80,3 <i>a</i>		
IC-Fe0	877,7 \pm 88,3 <i>ab</i>	836,1 \pm 88,3 <i>ab</i>	740,8 \pm 99,5 <i>ab</i>	673,6 \pm 93,2 <i>a</i>	631,2 \pm 103,7 <i>b</i>	405,2 \pm 109,8 <i>b</i>	374,1 \pm 112,9 <i>b</i>	329,0 \pm 98,6 <i>b</i>	281,6 \pm 87,5 <i>b</i>		
MC-Fe1	860,8 \pm 104,3 <i>a</i>	891,9 \pm 105,1 <i>bc</i>	862,4 \pm 84,3 <i>c</i>	871,7 \pm 110,5 <i>bc</i>	684,3 \pm 99,0 <i>b</i>	623,0 \pm 76,1 <i>c</i>	604,2 \pm 72,6 <i>c</i>	557,8 \pm 84,9 <i>c</i>	497,6 \pm 91,5 <i>c</i>		
IC-Fe1	884,8 \pm 88,7 <i>ab</i>	828,9 \pm 81,6 <i>ab</i>	819,8 \pm 81,2 <i>bc</i>	806,1 \pm 79,0 <i>b</i>	795,0 \pm 81,9 <i>cd</i>	698,6 \pm 90,5 <i>c</i>	576,9 \pm 84,9 <i>c</i>	570,9 \pm 87,5 <i>c</i>	473,8 \pm 85,5 <i>c</i>		
MC-Fe5	955,4 \pm 86,1 <i>b</i>	937,9 \pm 91,2 <i>b</i>	890,6 \pm 101,3 <i>c</i>	868,1 \pm 99,5 <i>bc</i>	855,1 \pm 11,6 <i>cd</i>	806,8 \pm 104,3 <i>d</i>	762,6 \pm 106,4 <i>d</i>	746,2 \pm 99,1 <i>d</i>	725,9 \pm 104,6 <i>d</i>		
IC-Fe5	901,3 \pm 99,8 <i>ab</i>	887,4 \pm 94,9 <i>bc</i>	907,4 \pm 92,3 <i>c</i>	915,9 \pm 89,7 <i>c</i>	930,6 \pm 77,1 <i>d</i>	900,0 \pm 86,0 <i>e</i>	918,2 \pm 89,6 <i>e</i>	907,4 \pm 82,6 <i>e</i>	777,8 \pm 95,3 <i>d</i>		

Através da análise conjunta do gráfico 5.1 e da tabela 5.1, podemos evidenciar que no dia 8, surgiram os primeiros indícios de clorose férrica nas plantas das modalidades de Fe0. Já nas plantas das modalidades de Fe1 podemos registrar que os primeiros sintomas de carência férrica ocorreram no dia 13.

Comparativamente entre o IC-Fe0 e MC-Fe0 existem diferenças estatisticamente significativas a partir do dia 13 e estas permanecem até ao fim do ensaio, mais concretamente, a partir deste dia, o valor médio de clorofila da modalidade IC-Fe0 é significativamente superior ao da modalidade MC-Fe0. Estes resultados indicam que a gramínea tem um efeito atenuante na severidade da clorose férrica da hortícola. Dado que não existe Fe na solução nutritiva, a possível libertação de compostos por parte da gramínea, como fitosideróforos e outros metabolitos polares, influenciam positivamente a nutrição da hortícola. Diversos estudos revelam que os fitosideróforos têm afinidade para ligarem-se a outros micronutrientes como o Zn e Mn (Banakar et al., 2017; Cakmak et al., 1994; Römheld & Marschner, 1986; Zuo & Zhang, 2009). O Zn à semelhança do Fe é um metal de transição e participa em inúmeros processos metabólicos como a síntese de aminoácidos e a fotossíntese, já o Mn para além de ser um ativador enzimático, é igualmente um importante constituinte do fotossistema II (Broadley et al., 2011), portanto é provável que o valor superior de clorofila total na modalidade IC-Fe0 face a MC-Fe0 seja devida a uma maior facilidade de absorção de Zn e de Mn e respetivas consequências metabólicas, associada e potenciada por uma absorção de metabolitos polares como açúcares, ácidos orgânicos, lípidos e aminoácidos que contribuem positivamente na nutrição vegetal (Dietz et al., 2020).

Tal como esperado, as modalidades com o tratamento Fe1 (MC-Fe1 e IC-Fe1) apresentam sintomas de clorose férrica mais tarde do que as modalidades do tratamento Fe0 (MC-Fe0 e IC-Fe0). Apenas no dia 13 existem diferenças significativas entre as duas modalidades IC-Fe1 e MC-Fe1, isto é, somente neste dia o valor médio de clorofila total das plantas de IC-Fe1 é significativamente superior ao da modalidade MC-Fe1, posteriormente esta diferença dissipa-se ao longo do ensaio. Estes dados reforçam o efeito positivo da *P. pratensis* na nutrição férrica da *B. oleraceae*. Com a diminuição substancial do Fe presente na solução nutritiva, a gramínea ativa a sua estratégia complexante libertando fitosideróforos para a solução nutritiva. Estes complexam o Fe ainda existente na solução e disponibilizam igualmente à hortícola uma fonte de Fe (Cesco et al., 2006;

Dai et al., 2019), que permitiu retardar a diminuição da clorofila total em comparação com MC-Fe1.

As diferenças entre as modalidades de IC-Fe5 e MC-Fe5 começam a surgir, com relevância estatística, no dia 21, onde o valor médio da clorofila total da modalidade IC-Fe5 é estatisticamente superior ao de MC-Fe5 quase até ao fim do ensaio, esta mantém-se até ao dia 29. Através da análise do gráfico 5.1 verificamos que a modalidade MC-Fe5 segue uma tendência de diminuição da clorofila total, desde o início do ensaio, já na modalidade IC-Fe5, esta tendência ocorre apenas numa primeira fase entre o dia 13 e o dia 21, supondo que durante este período ocorre uma carência de Fe, a gramínea responde a este *stress* com a sua estratégia complexante, o que resulta num incremento do valor de clorofila total, ainda que ligeiro, e consequentemente num atraso da queda deste valor. Este efeito pode estar correlacionado com o aproveitamento da hortícola dos complexos de Fe formados pelos fitosideróforos libertados pela gramínea (Cesco et al., 2006; Dai et al., 2019), que atingem o seu pico de concentração 3-5 dias após o início da carência férrica, dependente da espécie (Sadeghzadeh et al., 2021), originando a inflexão da tendência negativa da clorofila total.

Particularmente no dia 13, a média dos valores de clorofila entre o IC-Fe0 e MC-Fe1 não apresentam nenhuma diferença significativa, ou seja, nesse instante o efeito da gramínea na hortícola é de tal forma significativo que a modalidade IC-Fe0 equipara-se à modalidade MC-Fe1, no parâmetro da clorofila. Este efeito também acontece precisamente neste dia entre as modalidades IC-Fe1 e MC-Fe5. Em ambos os casos seria exetável que a diferença de concentrações de Fe da solução nutritiva nunca possibilitasse valores de clorofila semelhantes entre estas modalidades. Este resultado reforça, deste modo, a tese de aproveitamento da hortícola da estratégia complexante da gramínea.

Em suma, para as modalidades com a mesma concentração de Fe foi sempre identificada, pelo menos uma vez, diferença estatisticamente significativa entre a modalidade de *intercropping* e de *monocropping*. Isto significa que a gramínea, com a possível secreção de fitosideróforos, estimula na hortícola, diversos processos metabólicos com efeitos diretos na clorofila (Dai et al., 2019; Zuo & Zhang, 2009). Sabemos que as gramíneas e em concreto a *P. pratensis* excreta também outros metabolitos para além de fitosideróforos, tais como aminoácidos, álcoois, ácidos orgânicos, nucleótidos, compostos fenólicos e lípidos que podem resultar num efeito adicional e melhorador da clorofila total (Dietz et al., 2020).

5.1.3 Atividade da Quelato de Fe(III)-redutase

O gráfico 5.2 apresenta a atividade do enzima QFR nos ápices radiculares da *B. oleraceae*, nas seis modalidades e no final do ensaio. As modalidades com Fe0 apresentam valores de atividade do enzima estatisticamente superior às restantes, já as modalidades com Fe1 apresentam os valores intermédios, enquanto as modalidades com Fe5 são aquelas que apresentam, em comparação, menor atividade deste enzima. Estes resultados são coincidentes com a bibliografia, após o surgimento e agravamento da clorose férrica, ocorre um processo de indução da expressão do gene FRO codificante do enzima QFR na raiz, conduzindo a uma maior produção deste enzima que através do NADPH reduz o Fe^{3+} a Fe^{2+} (Gama, 2017; Robinson et al., 1999).

Ainda é possível constatar que não existem diferenças significativas entre modalidades de IC e MC com a mesma concentração de Fe. Isto indica que quaisquer compostos libertados pelas gramíneas, possivelmente fitosideróforos e outros metabolitos polares, não modificaram o comportamento do enzima, que em situação de deficiência de Fe aumenta a sua atividade, acompanhada pela acidificação da solução, isto é, o *intercropping* não é uma limitação à estratégia I (Gama, 2017; Pestana et al., 2012).

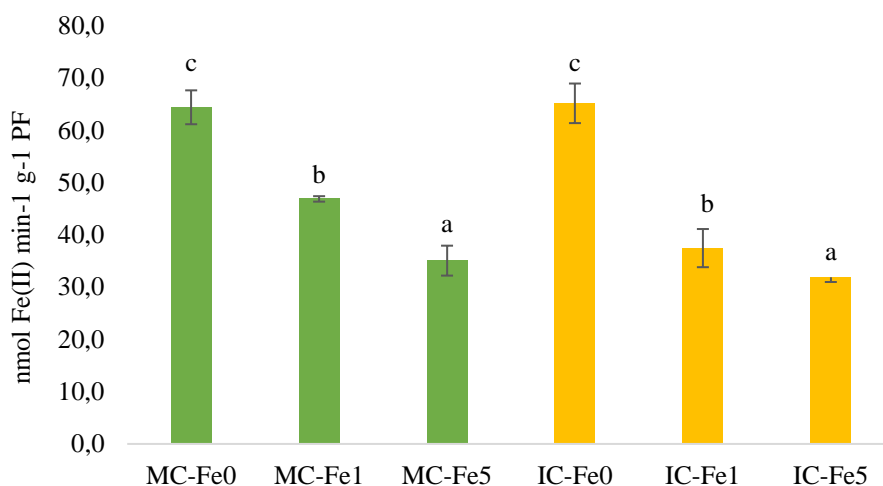


Gráfico 5.2 Atividade da QFR (nmol Fe (II). min⁻¹. g⁻¹ pf), determinado nos ápices radiculares da *B. oleraceae* para cada modalidade, no final do Ensaio I. Foram usados os valores médios e respetivo desvio padrão, as colunas com a mesma letra não apresentam diferenças significativas ($p > 0,05$, teste de Tuckey)

5.1.4 Morfologia e Biomassa Final

Ao nível da biomassa final, os valores obtidos não apresentam diferenças significativas relevantes (Tabela 5.2). De salientar que o volume radicular apresenta sempre valores tendencialmente superiores, ainda que não significativos, nas modalidades de *intercropping*, isto é coincidente com a literatura que refere que num sistema de consociação existe tendencialmente maior desenvolvimento radicular das culturas, sobretudo em profundidade, provavelmente motivado pela competição entre espécies (Ramirez-Garcia et al., 2013; Wang et al., 2018).

Através da análise do número total de folhas e a altura do caule é possível confirmar a importância do Fe para as plantas, como participante de inúmeros processos metabólicos que originam um aumento da biomassa das plantas (Pestana & Varennes, 2004). Em ambos os parâmetros, nas modalidades com Fe na solução nutritiva (à exceção de IC-Fe1) apresentam valores significativamente superiores aos das modalidades sem qualquer Fe.

A maior razão PR/PA (Tabela 5.3), ainda que pouco significativa para as modalidades de Fe0, deve-se sobretudo à diminuição da produção de biomassa da parte aérea (Sadeghzadeh et al., 2021).

Tabela 5.2 Resultados médios \pm desvio padrão dos diferentes parâmetros da biomassa registrada no final do ensaio I por modalidades, em laboratório. Os valores representados pelas mesmas letras não apresentam diferenças significativa ($p>0,05$, teste de Tukey).

Modalidade	Vol Raiz (ml)	pf Raiz (g)	ps Raiz (g)	Nº Folhas Total	Nº Folhas Novas	Nº Folhas Velhas	pf Folhas Novas (g)	pf Folhas Velhas (g)	ps Folhas Novas (g)	ps Folhas Velhas (g)	Altura (cm)	pf Cante (g)	ps Cante (g)	Ø Cante
MC-Fe0	2,3 \pm 0,6 <i>a</i>	1,8 \pm 0,6 <i>a</i>	0,2 \pm 0,1 <i>a</i>	7,7 \pm 0,6 <i>a</i>	3,0 \pm 0,0 <i>a</i>	4,7 \pm 0,6 <i>b</i>	2,4 \pm 0,2 <i>a</i>	4,6 \pm 1,1 <i>a</i>	0,3 \pm 0,1 <i>a</i>	0,5 \pm 0,1 <i>a</i>	12,2 \pm 2,0 <i>ab</i>	1,4 \pm 0,2 <i>a</i>	0,2 \pm 0,0 <i>a</i>	2,9 \pm 0,5 <i>a</i>
IC-Fe0	2,8 \pm 0,8 <i>ab</i>	1,8 \pm 0,5 <i>a</i>	0,2 \pm 0,1 <i>a</i>	8,3 \pm 0,6 <i>a</i>	3,3 \pm 0,6 <i>a</i>	5,0 \pm 0,0 <i>b</i>	2,9 \pm 0,8 <i>a</i>	4,8 \pm 0,4 <i>a</i>	0,3 \pm 0,1 <i>a</i>	0,5 \pm 0,1 <i>a</i>	9,8 \pm 1,0 <i>a</i>	1,4 \pm 0,2 <i>a</i>	0,1 \pm 0,1 <i>a</i>	3,5 \pm 0,3 <i>ab</i>
MC-Fe1	4,0 \pm 0,0 <i>b</i> <i>c</i>	2,7 \pm 0,4 <i>a</i>	0,3 \pm 0,1 <i>a</i>	10,0 \pm 0,0 <i>b</i>	3,7 \pm 0,6 <i>a</i>	6,3 \pm 0,6 <i>c</i>	5,2 \pm 0,3 <i>ab</i>	10,5 \pm 0,3 <i>c</i>	0,6 \pm 0,1 <i>a</i>	1,1 \pm 0,0 <i>c</i>	14,0 \pm 1,3 <i>bc</i>	3,5 \pm 0,2 <i>c</i>	0,3 \pm 0,1 <i>a</i>	4,5 \pm 0,3 <i>b</i>
IC-Fe1	5,0 \pm 1,0 <i>c</i>	2,9 \pm 0,9 <i>a</i>	0,2 \pm 0,1 <i>a</i>	7,3 \pm 0,6 <i>a</i>	4,0 \pm 0,0 <i>a</i>	3,3 \pm 0,6 <i>a</i>	4,7 \pm 0,7 <i>a</i>	3,8 \pm 1,1 <i>a</i>	0,5 \pm 0,1 <i>a</i>	0,4 \pm 0,2 <i>a</i>	11,8 \pm 0,3 <i>ab</i>	2,0 \pm 0,2 <i>ab</i>	0,1 \pm 0,1 <i>a</i>	4,1 \pm 0,8 <i>ab</i>
MC-Fe5	4,0 \pm 0,0 <i>b</i> <i>c</i>	2,8 \pm 0,3 <i>a</i>	0,3 \pm 0,1 <i>a</i>	10,7 \pm 0,6 <i>b</i>	5,7 \pm 0,6 <i>b</i>	5,0 \pm 0,0 <i>b</i>	11,8 \pm 3,1 <i>c</i>	7,8 \pm 1,7 <i>bc</i>	1,2 \pm 0,3 <i>b</i>	0,9 \pm 0,2 <i>bc</i>	15,3 \pm 1,5 <i>cd</i>	3,0 \pm 1,2 <i>bc</i>	0,3 \pm 0,2 <i>a</i>	4,7 \pm 0,6 <i>b</i>
IC-Fe5	5,0 \pm 0,0 <i>c</i>	3,2 \pm 0,7 <i>a</i>	0,4 \pm 0,1 <i>a</i>	10,7 \pm 0,6 <i>b</i>	5,7 \pm 0,6 <i>b</i>	5,0 \pm 0,0 <i>b</i>	9,0 \pm 1,8 <i>bc</i>	6,1 \pm 0,9 <i>ab</i>	1,0 \pm 0,2 <i>b</i>	0,7 \pm 0,1 <i>ab</i>	16,0 \pm 0,0 <i>d</i>	2,8 \pm 0,6 <i>bc</i>	0,3 \pm 0,1 <i>a</i>	4,4 \pm 0,2 <i>b</i>

Tabela 5.3 Resultados médios da razão PR/PA para cada modalidade, com o respectivo desvio padrão. Esta razão foi calculada através do quociente entre o peso seco da raiz (PR) e o peso seco da parte aérea (PA). Os valores representados pelas mesmas letras não apresentam diferenças significativa ($p > 0,05$, teste de Tukey)

Modalidade	Razão PR/ PA
MC-Fe0	$0,30 \pm 0,05$ <i>b</i>
IC-Fe0	$0,29 \pm 0,01$ <i>b</i>
MC-Fe1	$0,20 \pm 0,03$ <i>ab</i>
IC-Fe1	$0,27 \pm 0,01$ <i>ab</i>
MC-Fe5	$0,16 \pm 0,04$ <i>a</i>
IC-Fe5	$0,24 \pm 0,04$ <i>ab</i>

Ao nível da morfologia radicular, foi possível confirmar visualmente a formação e lateralização de raízes secundárias como resposta à carência férrica (Figura 5.1) (Jiménez et al., 2019).

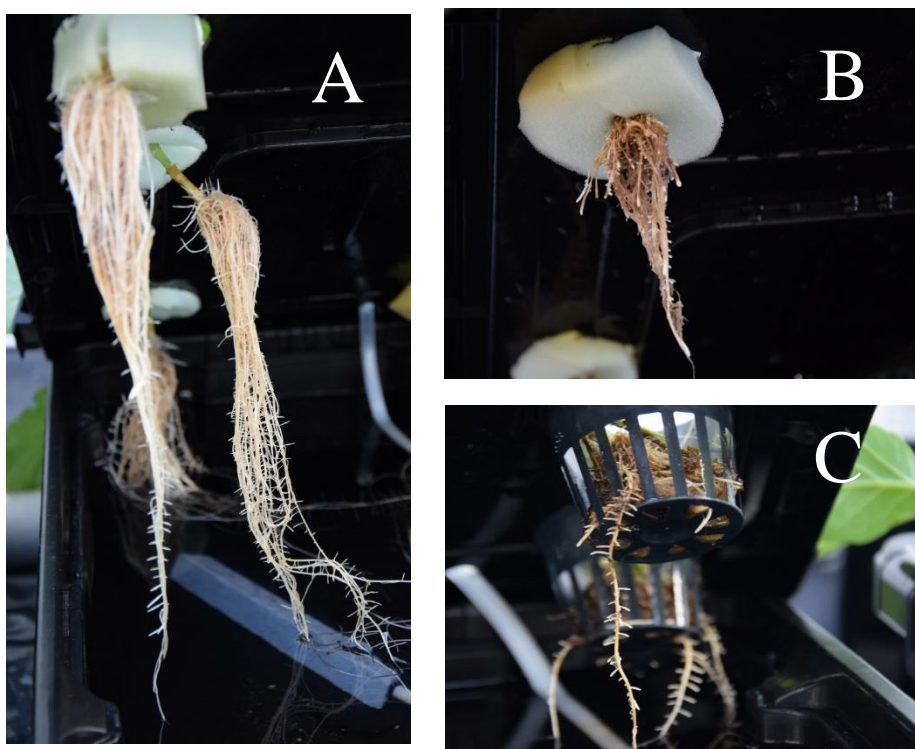


Figura 5.1 Formação e lateralização de ápices secundários em resposta à carência férrica nas modalidades: **A)** MC-Fe1; **B)** Fe0-MC; **C)** Fe0-IC.

5.1.5 Fluorescência da clorofila

A análise da fluorescência da clorofila permite-nos obter a eficiência do fotossistema II, e consequentemente da fase fotoquímica inerente à fotossíntese. Esta via compete naturalmente com dois outros processos que acontecem, a reemissão como calor e a reemissão como luz (fluorescência). Este parâmetro F_v/F_m indica-nos a percentagem de energia empregue para via fotoquímica, definindo, assim, a eficiência do fotossistema II (Murchie & Lawson, 2013).

O gráfico 5.3 demonstra que nas modalidades com Fe a eficiência do fotossistema II não é alterada, porém nas modalidades sem Fe na solução nutritiva (MC-Fe0 e IC-Fe0) este valor é relativamente muito inferior. Tudo isto é coincidente com a literatura que refere que em estados cloróticos mais severos, dada a diminuição dos pigmentos fotossintéticos (clorofila a e b), também ocorre uma diminuição na eficiência do fotossistema II (Abadía et al., 1999).

Ainda neste gráfico é possível observar uma diferença significativa no parâmetro F_v/F_m entre a modalidade MC-Fe0 e IC-Fe0, ambas sem a presença de Fe na constituição das suas soluções nutritivas. A modalidade IC-Fe0 apresenta um valor de F_v/F_m estatisticamente superior ao da modalidade MC-Fe0, isto indica que a hortícola da modalidade de IC-Fe0 revela uma eficiência do fotossistema II superior a MC-Fe0, apesar deste valor seja muito inferior ao da eficiência normal do fotossistema II (~0,8). Este efeito atenuante está provavelmente relacionado com o efeito dos exsudados radiculares da gramínea na hortícola.

Através da tabela 5.4, podemos analisar o efeito do *stress* provocado pela clorose férrica no valor da fluorescência basal e indiretamente nos processos fotoquímicos (Maxwell & Johnson, 2000; Murchie & Lawson, 2013). Os dados de F_o são significativamente superiores nas modalidades de Fe0 (Fe0-MC e Fe0-IC), estes valores comparativamente elevados determinam que nestes casos, grande parte da luz absorvida pelo aparelho fotossintético é destacada para emissão de fluorescência, retirando assim eficiência na utilização da luz para via fotoquímica, o que é coincidente com os valores de F_v/F_m acima apresentados, reveladores de uma baixa eficiência do fotossistema II (Maxwell & Johnson, 2000).

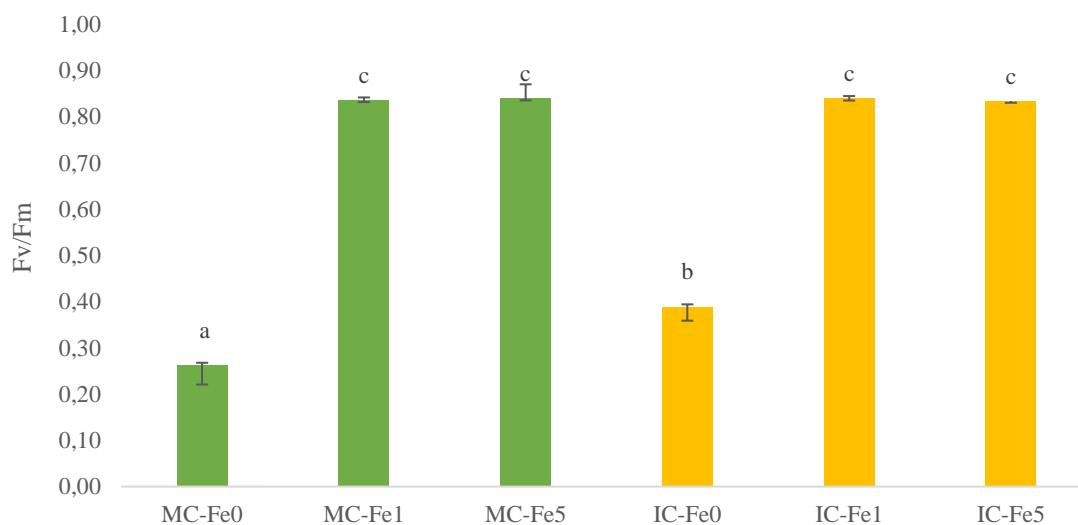


Gráfico 5.3 Indicadores da eficiência do fotossistema II, obtidos pela determinação da fluorescência em *B. oleraceae*, revelado pelo cálculo do parâmetro Fv/Fm. Foram usados os valores médios e respectivo desvio padrão, as colunas com a mesma letra não apresentam diferenças significativas ($p > 0,05$, teste de Tuckey)

Tabela 5.4 Valores da fluorescência basal registada nas diferentes modalidades, obtidos pela determinação da fluorescência em *B. oleraceae*, esta evidencia a quantidade de luz que é destacada para emissão de fluorescência, sendo um indicador indireto da eficiência da utilização da luz nos cloroplastos. Foram usados os valores médios e respectivo desvio padrão, os resultados representados pelas mesmas letras não apresentam diferenças significativa ($p > 0,05$, teste de Tukey)

Modalidades	Fo ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
MC-Fe0	1507,8 \pm 201,5 <i>b</i>
IC-Fe0	1724,3 \pm 144,9 <i>b</i>
MC-Fe1	529,2 \pm 10,4 <i>a</i>
IC-Fe1	541,5 \pm 94,7 <i>a</i>
MC-Fe5	580,5 \pm 71,7 <i>a</i>
IC-Fe5	503,2 \pm 55,5 <i>a</i>

5.2 Ensaio II

5.2.1 Quantificação da Capacidade Quelante do Fe (II), do teor de fenóis totais e da concentração proteica nos extratos

Com o recurso da espectrofotometria, através da leitura das absorvâncias e respetivas conversões dos dados obtidos foi possível obter a capacidade quelante do Fe (II), o total de compostos fenólicos e a concentração proteica para os dois extratos (Tabela 5.5). A capacidade quelante determina-se como a capacidade de formar complexos estáveis e solúveis de Fe^{2+} com compostos orgânicos, facilitando a absorção de ferro na planta. Já os compostos fenólicos apresentam uma grande diversidade de famílias (Tsimogiannis & Oreopoulou, 2019) e conseqüentemente originam inúmeros impactos na fisiologia e no crescimento da planta tais como resistência a doenças, fonte de carbono, eliminação de radicais e efeito quelante e de redução do Fe e outros metais (Chong et al., 2007; Stringlis et al., 2019). As proteínas desempenham várias e importantes funções em toda a biologia vegetal, tais como funções enzimáticas, funcionais, estruturais, nutricionais e de armazenamento (Rasheed et al., 2020).

É possível verificar que o extrato foliar apesar de ter uma capacidade quelante do Fe^{2+} inferior ao do extrato radicular, apresenta na sua composição concentrações superiores de compostos fenólicos e proteicos.

Através de dados obtidos num trabalho ainda não publicado foi possível aferir alguns exsudados radiculares da *P. pratensis* tais como o ácido 3,3-dimetilglutárico, o N-acetil-DL-triptofano e o ácido 2-furoico. De registar que as condições de desenvolvimento da gramínea para posterior extração destes exsudados foram idênticas às praticadas no ensaio II, permitindo assim extrapolar estes resultados para uma composição mais concreta do extrato radicular aplicado no ensaio II.

O ácido 3,3-dimetilglutárico é um composto derivado do ácido glutárico, este por sua vez aumenta os níveis de NADH dentro das células e aumenta igualmente a expressão de monooxigenases, enzimas participantes nas reações de oxidação-redução (Zhang et al., 2021). Derivados deste ácido glutárico aparecem associados à nicotianamina (Fig 5.2), participando assim na biossíntese de fitosideróforos, particularmente de ácidos

mugineicos (Mori, 1999). Já o N-acetil-DL-triptofano é um composto derivado do triptofano, um aminoácido essencial que é precursor de auxinas como o ácido indolacético (Figura 5.3), que na sua biossíntese liberta amoníaco, existindo algumas evidências que a sua aplicação foliar em algumas espécies influencia positivamente a clorofila, aumentando o crescimento e produtividade de algumas culturas (Mustafa et al., 2018).

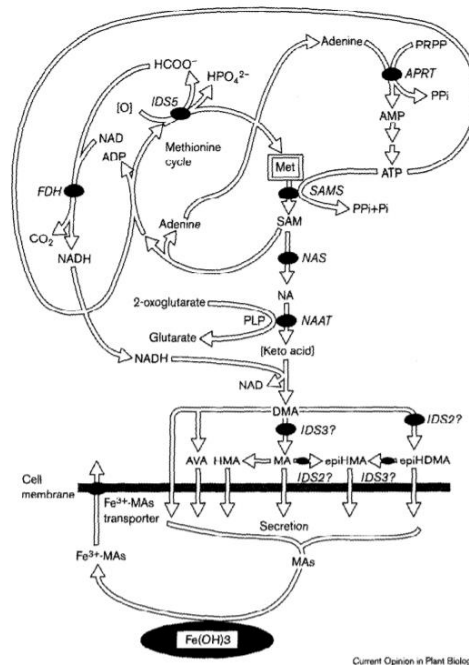


Figura 5.2 Via biosintética da família de fitosideróforos, os ácidos mugineicos, onde evidencia-se a participação de derivados do ácido glutárico (formação de glutarato).
Fonte: Mori (1999)

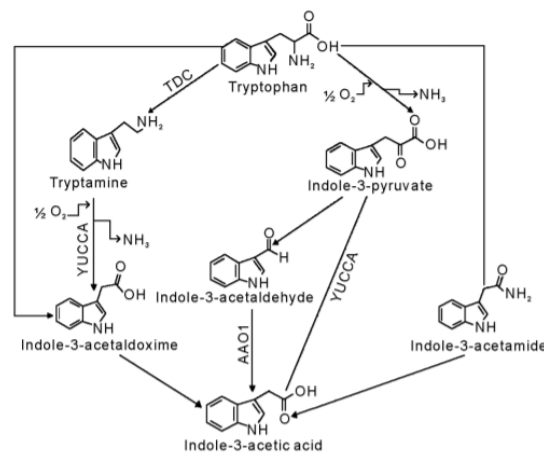


Figura 5.3 Esquema da biossíntese da auxina ácido indol-acético a partir de triptofano, com a libertação de amoníaco. Fonte: Mustafa et al. (2018)

Tabela 5.5 Resultados médios da determinação realizada nos dois extratos, quanto à atividade quelante, aos fenóis totais e à concentração proteica, através da conversão dos dados das absorvâncias obtidos por espectrofotometria.

Tipo de extrato	Capacidade quelante de Fe (II) (mM)	Total de compostos fenólicos (mg L ⁻¹)	Concentração proteica (µg 1000µl ⁻¹)
Extrato Foliar	0,93	43,04	87,3
Extrato Radicular	1,34	10,32	50,9

5.2.2 Clorofila Folhas Novas

Tal como referido no ensaio I, as folhas novas são o melhor indicador para detetar o início da clorose férrica, dada a baixa mobilidade do Fe na planta. Após análise do gráfico podemos verificar que estes sintomas de carência férrica iniciam-se e intensificam-se a partir do dia 6 (Figura 5.2).

Após a deteção visual da clorose férrica no dia 6, iniciaram-se as pulverizações com os extratos logo no dia 7 e a partir daí estas foram intervaladas por 4 dias, à exceção da última pulverização, na tentativa de contrariar o rápido agravamento da clorose, porém sem sucesso. Estas perfizeram um total de 4 pulverizações (gráfico 5.4).



Figura 5.4 Primeiros sintomas visuais de clorose férrica na modalidade Fe0, registados no dia 6. O aparecimento destes sintomas determinou o início das pulverizações com os extratos.

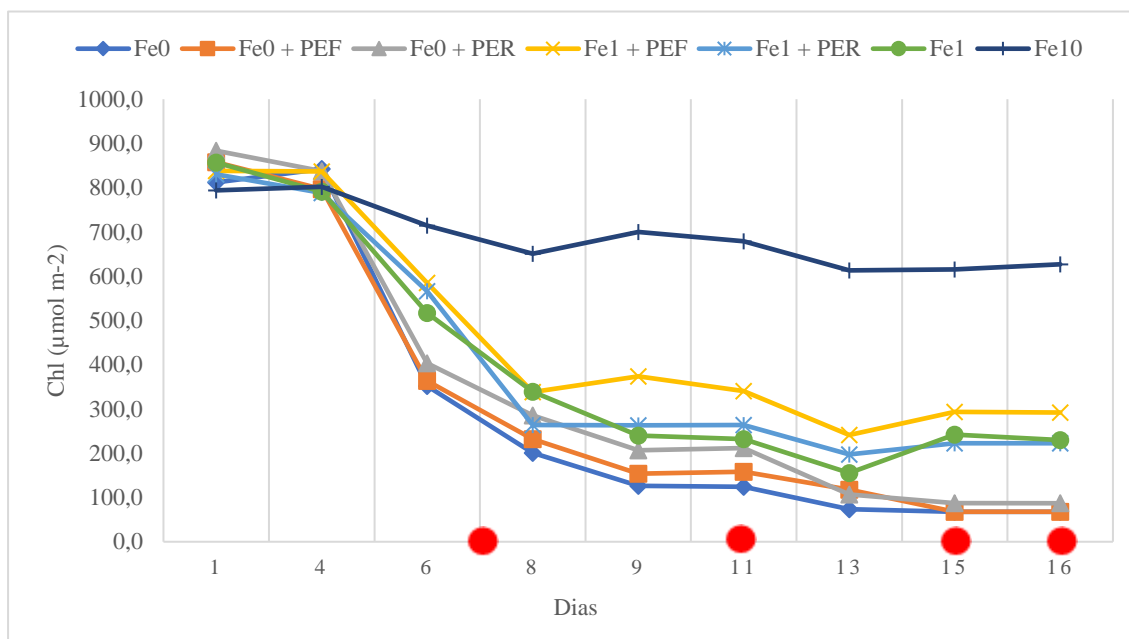


Gráfico 5.4 Evolução dos valores médios das concentrações de clorofila total das folhas novas ($\mu\text{mol. m}^{-2}$) ao longo do ensaio II, consoantes as modalidades. Os pontos vermelhos marcam as datas das pulverizações.

A partir do dia 9 e sobretudo no dia 11, a modalidade Fe0+PER apresenta um valor de clorofila total estatisticamente superior ao controlo negativo e à modalidade Fe0+PEF (Tabela 5.6 e gráfico 5.4). Esta diferença atenua-se a partir do 13. O respetivo extrato poderá ter na sua composição Fe, ainda em que pequena concentração, transitório da sua fase de viveiro, dado que as raízes são um dos principais locais de armazenamento de Fe na planta (Pestana et al., 2011). Este efeito pode ter sido amplificado pela capacidade quelante do Fe^{2+} do extrato radicular e pela possível ação do N-acetil-DL-triptofano (Mustafa et al., 2018).

Tabela 5.6 Concentração da clorofila total nas folhas novas da *B. oleraceae* ($\mu\text{mol.m}^{-2}$) ao longo da duração do ensaio II. Os resultados são valores médios \pm desvio padrão. Os valores representados pelas mesmas letras não apresentam diferenças significativas ($p>0,05$, teste de Tukey)

Modalidade	Média Clorofila Total ($\mu\text{mol.m}^{-2}$)										
	1	4	6	8	9	11	13	15	16		
Fe0	812,0 \pm 81,9 <i>ab</i>	842,1 \pm 96,2 <i>a</i>	352,1 \pm 106,4 <i>a</i>	200,7 \pm 108,9 <i>a</i>	126,3 \pm 95,7 <i>a</i>	124,3 \pm 94,6 <i>a</i>	73,7 \pm 81,4 <i>a</i>	67,6 \pm 67,8 <i>a</i>	67,6 \pm 67,8 <i>a</i>		
Fe0 + PEF	857,6 \pm 85,7 <i>ab</i>	796,6 \pm 113,0 <i>a</i>	363,3 \pm 105,3 <i>a</i>	231,9 \pm 112,8 <i>ab</i>	153,8 \pm 114,5 <i>ab</i>	157,8 \pm 113,9 <i>ab</i>	117,9 \pm 100,8 <i>ab</i>	67,9 \pm 68,2 <i>a</i>	67,8 \pm 67,9 <i>a</i>		
Fe0 + PER	883,5 \pm 95,7 <i>b</i>	837,1 \pm 105,1 <i>a</i>	403,5 \pm 85,4 <i>a</i>	285,8 \pm 139,0 <i>ab</i>	206,3 \pm 96,3 <i>bc</i>	211,8 \pm 93,0 <i>bc</i>	106,6 \pm 84,9 <i>ab</i>	87,5 \pm 77,9 <i>a</i>	87,0 \pm 77,5 <i>a</i>		
Fe1 + PEF	838,0 \pm 97,2 <i>ab</i>	836,8 \pm 83,8 <i>a</i>	584,8 \pm 89,8 <i>b</i>	338,6 \pm 125,0 <i>b</i>	373,9 \pm 123,1 <i>d</i>	340,2 \pm 106,0 <i>d</i>	241,1 \pm 86,7 <i>d</i>	293,3 \pm 114,4 <i>b</i>	291,9 \pm 112,9 <i>b</i>		
Fe1 + PER	830,2 \pm 97,0 <i>ab</i>	788,2 \pm 78,1 <i>a</i>	566,5 \pm 123,0 <i>b</i>	264,1 \pm 111,0 <i>ab</i>	263,2 \pm 88,2 <i>c</i>	264,1 \pm 81,1 <i>c</i>	197,3 \pm 107,7 <i>cd</i>	222,4 \pm 93,8 <i>b</i>	222,4 \pm 91,1 <i>b</i>		
Fe1	856,7 \pm 88,6 <i>ab</i>	791,3 \pm 79,1 <i>a</i>	516,7 \pm 110,5 <i>b</i>	339,1 \pm 106,8 <i>b</i>	239,9 \pm 98,8 <i>bc</i>	231,9 \pm 86,9 <i>c</i>	155,4 \pm 93,7 <i>bc</i>	242,0 \pm 109,5 <i>b</i>	229,5 \pm 102,9 <i>b</i>		
Fe10	794,1 \pm 76,1 <i>a</i>	802,1 \pm 76,1 <i>a</i>	714,3 \pm 101,3 <i>c</i>	650,8 \pm 124,8 <i>c</i>	700,1 \pm 101,0 <i>e</i>	678,8 \pm 90,0 <i>e</i>	613,2 \pm 109,4 <i>e</i>	615,4 \pm 118,2 <i>c</i>	627,2 \pm 105,0 <i>c</i>		

Já nas modalidades Fe1, Fe1+PEF e Fe1+PER é possível verificar que a partir do dia 9 e até ao dia 13, as modalidades pulverizadas apresentam um valor de clorofila total superior ao Fe1, com maior relevância para a modalidade Fe1+PEF (Figura 5.3). Podemos assim determinar que durante este período, os extratos poderão ter tido uma ação bioestimulante na hortícola com expressão na clorofila total, provavelmente resultado da ação conjunta dos constituintes que compunham os extratos, particularmente do extrato foliar, que apresenta um índice de fenóis e proteínas superior (Saavedra et al., 2020).



Figura 5.5 Diferença visual na coloração das folhas novas, motivada pela carência férrica, no dia 9 do ensaio II, entre a modalidade Fe1 (esquerda) e a modalidade Fe1+PEF (direita).

Aparentemente as duas primeiras pulverizações terão sido efetivas, apesar do seu efeito transitório, graças ao possível Fe existente nos extratos e/ou ação bioestimulante doutros compostos presentes como fenóis, aminoácidos e ácidos orgânicos, sendo que os primeiros apresentam elevada afinidade a formar quelatos estáveis com iões metálicos, os segundos são a estrutura base das proteínas e conseqüentemente do metabolismo vegetal e os últimos podem apresentar ação complexante e também serem participantes na biossíntese de fitosideróforos (Mori, 1999; Saavedra et al., 2020; Zhao et al., 2011).

5.2.3 Morfologia e Biomassa Final

Em relação ao crescimento vegetativo e biomassa no final do ensaio (Tabela 5.7), não existem dados significativamente diferentes e relevantes para os objetivos do ensaio, com exceção do comprimento da raiz. Particularmente neste parâmetro, os valores das modalidades Fe1, Fe1+PER e Fe1+PEF apresentam mais elevados, apesar dessa diferença não ser significativa comparando com Fe10. Esta tendência, ainda que não significativa, pode sugerir que à medida que o nível de Fe na solução diminui moderadamente, existe um maior alongamento da raiz primária (Ward et al., 2008).

As pulverizações com extratos não tiveram qualquer efeito na biomassa como é evidente pelos parâmetros e contrariamente ao esperado, tendo em conta outros ensaios (Mustafa et al., 2018; Pestana et al., 2011; Saavedra et al., 2020; Ward et al., 2008).

Tabela 5.7 Resultados médios \pm desvio padrão dos diferentes parâmetros da biomassa registrada no final do ensaio II por modalidades, em laboratório. Os valores representados pelas mesmas letras não apresentam diferenças significativa ($p>0,05$, teste de Tukey)

Modalidades	Vol Raiz(ml)	Comp Raiz (cm)	pf Raiz(g)	ps Raiz(g)	Nº Folhas Velhas	pfFolhas Velhas (g)	ps Folhas Velhas (g)	Ø Caule (mm)	Altura Caule (cm)	pfCaule (g)	ps Caule (g)
Fe0	3,0 \pm 0,7 <i>a</i>	20,0 \pm 6,5 <i>ab</i>	3,5 \pm 0,4 <i>a</i>	0,3 \pm 0,0 <i>a</i>	2,3 \pm 0,5 <i>a</i>	3,2 \pm 0,7 <i>a</i>	0,3 \pm 0,1 <i>a</i>	3,9 \pm 0,0 <i>a</i>	8,8 \pm 1,3 <i>a</i>	1,4 \pm 0,1 <i>a</i>	0,1 \pm 0,0 <i>a</i>
Fe0+PER	3,0 \pm 0,7 <i>a</i>	15,3 \pm 1,9 <i>a</i>	3,5 \pm 0,7 <i>a</i>	0,4 \pm 0,2 <i>a</i>	3,0 \pm 0,0 <i>a</i>	4,1 \pm 0,2 <i>a</i>	0,4 \pm 0,1 <i>a</i>	3,8 \pm 0,2 <i>a</i>	7,9 \pm 0,7 <i>a</i>	1,3 \pm 0,2 <i>a</i>	0,1 \pm 0,0 <i>a</i>
Fe0+PEF	3,3 \pm 0,5 <i>a</i>	16,2 \pm 0,2 <i>ab</i>	3,8 \pm 0,5 <i>a</i>	0,4 \pm 0,1 <i>a</i>	2,7 \pm 0,5 <i>a</i>	3,6 \pm 0,3 <i>a</i>	0,3 \pm 0,0 <i>a</i>	3,8 \pm 0,1 <i>a</i>	7,8 \pm 0,6 <i>a</i>	1,2 \pm 0,2 <i>a</i>	0,1 \pm 0,0 <i>a</i>
Fe1	3,3 \pm 0,4 <i>a</i>	33,0 \pm 1,2 <i>c</i>	6,1 \pm 1,7 <i>a</i>	0,6 \pm 0,2 <i>a</i>	2,8 \pm 0,0 <i>a</i>	6,3 \pm 2,2 <i>ab</i>	0,6 \pm 0,2 <i>ab</i>	4,5 \pm 0,6 <i>a</i>	8,1 \pm 0,2 <i>a</i>	1,8 \pm 0,4 <i>a</i>	0,1 \pm 0,0 <i>a</i>
Fe1+PEF	3,5 \pm 0,9 <i>a</i>	28,5 \pm 6,3 <i>bc</i>	5,3 \pm 1,5 <i>a</i>	0,5 \pm 0,2 <i>a</i>	3,3 \pm 0,4 <i>ab</i>	5,7 \pm 0,9 <i>ab</i>	0,6 \pm 0,1 <i>a</i>	4,1 \pm 0,03 <i>a</i>	7,6 \pm 0,4 <i>a</i>	1,5 \pm 0,3 <i>a</i>	0,1 \pm 0,0 <i>a</i>
Fe1+PER	3,0 \pm 0,0 <i>a</i>	32,5 \pm 2,9 <i>c</i>	5,8 \pm 0,7 <i>a</i>	0,5 \pm 0,2 <i>a</i>	3,0 \pm 0,4 <i>a</i>	5,3 \pm 1,1 <i>a</i>	0,5 \pm 0,1 <i>a</i>	3,8 \pm 0,03 <i>a</i>	7,3 \pm 0,4 <i>a</i>	1,2 \pm 0,2 <i>a</i>	0,1 \pm 0,0 <i>a</i>
Fe10	3,3 \pm 0,8 <i>a</i>	28,8 \pm 6,6 <i>bc</i>	6,8 \pm 3,0 <i>a</i>	0,7 \pm 0,3 <i>a</i>	4,5 \pm 0,4 <i>b</i>	12,3 \pm 6,1 <i>b</i>	1,3 \pm 0,6 <i>b</i>	4,5 \pm 0,04 <i>a</i>	8,6 \pm 1,2 <i>a</i>	2,0 \pm 0,8 <i>a</i>	0,1 \pm 0,1 <i>a</i>

6. Conclusões e considerações finais

Como um dos principais objetivos deste trabalho testou-se a possibilidade de em regime de consociação *B. oleraceae* L. + *P. pratensis*, existir um aproveitamento por parte da hortícola, da estratégia complexante da gramínea num sistema em que estão disponíveis diferentes concentrações de Fe.

Partindo do pressuposto da relação fisiológica entre o Fe e a clorofila, registou-se que nas modalidades de consociação, mesmo que em janelas temporais diferentes e independentemente da concentração de Fe, a gramínea tinha sempre um efeito positivo na hortícola, com reflexo sobre o valor de clorofila total desta. Este efeito é provavelmente resultado da excreção de fitosideróforos, que complexaram e solubilizaram o Fe e/ou outros metais (Zn e Mn), disponibilizando estes à absorção da hortícola, que depois incorpora-os nas suas vias metabólicas, em benefício próprio. Este efeito é também potenciado pela possível absorção de outros metabolitos benéficos exsudados pela gramínea para rizosfera. Apesar deste efeito benéfico na clorofila total, este não foi traduzido num aumento da biomassa.

A *B. oleraceae* revelou um comportamento típico face à carência férrica com o aumento da atividade da QFR e a diminuição da eficiência do fotossistema II, porém esta diminuição da eficiência do fotossistema II em Fe0 foi um pouco menos severa na modalidade de *intercropping* do que em *monocropping*, apesar do valor de eficiência continuar a ser insuficiente.

No seguimento deste primeiro ensaio, testou-se a aplicação de dois extratos de composições diferentes, ambos provenientes da *P. pratensis* (cultivada sem carência) sendo um da parte aérea e outro da parte radicular, numa hortícola em diferentes concentrações de Fe. Pretendeu-se analisar se na composição da *P. pratensis* existe algum metabolito capaz de mobilizar Fe endógeno da *B. oleraceae*, potenciando metabolicamente a hortícola e funcionando assim como bioestimulante.

As duas primeiras pulverizações foram as mais efetivas, promovendo a produção de clorofila total da *B. oleraceae*, embora os efeitos tenham sido ligeiros e transitórios. Estes devem-se provavelmente à composição de ambos extratos, que despoletaram diferentes respostas, o extrato radicular apresentou melhor resultado em Fe0, enquanto o

extrato foliar registou melhor desempenho em Fe1. Mais uma vez, as pulverizações não tiveram qualquer relevância no resultado da biomassa final.

Este segundo ensaio é complementar do primeiro, este possibilitou confirmar que possíveis metabolitos que estão presentes e são possivelmente exsudados pelas raízes de determinadas espécies de gramíneas poderão funcionar como bioestimulantes se aplicados foliarmente, faltando comprovar a natureza bioquímica exata dos compostos.

Conclui-se então que, a utilização da consociação com gramíneas pode representar uma solução para otimização do Fe em determinados contextos de campo, apesar de poder não ser para já, um substituto integral dos quelatos, pode contribuir para diminuição da aplicação destes, beneficiando o ambiente e economicamente as explorações. Conscientes que a passagem para realidade agronómica tem de ser sempre alicerçada num ponto de partida científico, daí a origem deste trabalho.

7. Referências bibliográficas

- Abadia, J. (1992). Leaf Responses to Fe Deficiency: A Review. *Journal of Plant Nutrition*, 15(10), 1699–1713. <https://doi.org/10.1080/01904169209364432>
- Abadia, J., & Abadia, A. (1993). Iron chelation in plants and soil microorganisms. In *Iron and pigments* (pp. 327–43). Academic Press Inc.
- Abadía, J., Morales, F., & Abadía, A. (1999). Photosystem II efficiency in low chlorophyll, iron-deficient leaves. *Plant and Soil*, 215(2), 183–192. <https://doi.org/10.1023/A:1004451728237>
- Banakar, R., Alvarez Fernandez, A., Díaz-Benito, P., Abadia, J., Capell, T., & Christou, P. (2017). Phytosiderophores determine thresholds for iron and zinc accumulation in biofortified rice endosperm while inhibiting the accumulation of cadmium. *Journal of Experimental Botany*, 68(17), 4983–4995. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx304>
- Bienfait, H. F., Bino, R. J., van der Blik, A. M., Duivenvoorden, J. F., & Fontaine, J. M. (1983). Characterization of ferric reducing activity in roots of Fe-deficient *Phaseolus vulgaris*. *Physiologia Plantarum*, 59(2), 196–202. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1983.tb00757.x>
- Bocchini, M., Bartucca, M. L., Ciancaleoni, S., Mimmo, T., Cesco, S., Pii, Y., Del Buono, D. (2015). Iron deficiency in barley plants: Phytosiderophore release, iron translocation, and DNA methylation. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00514>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In *Analytical Biochemistry* (Vol. 72, pp. 248–254). <https://doi.org/10.1016/j.cj.2017.04.003>
- Broadley, M., Brown, P., Cakmak, I., Rengel, Z., & Zhao, F. (2011). Function of Nutrients: Micronutrients. In *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants: Third Edition*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00007-8>
- Brooker, R. W., Bennett, A. E., Cong, W. F., Daniell, T. J., George, T. S., Hallett, P. D., White, P. J. (2015). Improving intercropping: A synthesis of research in agronomy, plant physiology and ecology. *New Phytologist*, 206(1), 107–117. <https://doi.org/10.1111/nph.13132>
- Cakmak, S., Gülüt, K. Y., Marschner, H., & Graham, R. D. (1994). Effect of zinc and iron deficiency on phytosiderophore release in wheat genotypes differing in zinc efficiency. *Journal of Plant Nutrition*, 17(1), 1–17. <https://doi.org/10.1080/01904169409364706>
- Carter, P. (1971). Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). *Analytical Biochemistry*, 40(2), 450–458. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90405-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90405-2)
- Carvalho, S. M. P., & Vasconcelos, M. W. (2013). Producing more with less: Strategies and novel technologies for plant-based food biofortification. *Food Research International*, 54(1), 961–971. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.021>

- Cesco, S., Rombolà, A. D., Tagliavini, M., Varanini, Z., & Pinton, R. (2006). Phytosiderophores released by graminaceous species promote ⁵⁹Fe-uptake in citrus. *Plant and Soil*, *287*(1–2), 223–233. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-9069-4>
- Chen, Y., & Barak, P. (1982). Iron nutrition of plants in calcareous soils. *Advances in Agronomy*, *35*(C), 217–240. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60326-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60326-0)
- Chong, W. J., Guang, Y. Y., Yun, F. H., Tang, C., Wu, P., & Shao, J. Z. (2007). Iron Deficiency-Induced Secretion of Phenolics Facilitates the Reutilization of Root Apoplastic Iron in Red Clover. *Plant Physiology*, *144*(1), 278–285. <https://doi.org/10.1104/pp.107.095794>
- Conte, S. S., & Walker, E. L. (2011). Transporters contributing to iron trafficking in plants. *Molecular Plant*, *4*(3), 464–476. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr015>
- Curie, C., Panaviene, Z., Loulergue, C., Dellaporta, S. L., Briat, J. F., & Walker, E. L. (2001). Maize yellow stripe1 encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. *Nature*, *409*(6818), 346–349. <https://doi.org/10.1038/35053080>
- Dai, J., Qiu, W., Wang, N., Nakanishi, H., & Zuo, Y. (2018). Comparative transcriptomic analysis of the roots of intercropped peanut and maize reveals novel insights into peanut iron nutrition. *Plant Physiology and Biochemistry*, *127*, 516–524. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.04.024>
- Dai, J., Qiu, W., Wang, N., Wang, T., Nakanishi, H., & Zuo, Y. (2019). From leguminosae/gramineae intercropping systems to see benefits of intercropping on iron nutrition. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00605>
- Dey, S., Regon, P., Kar, S., & Panda, S. K. (2020). Chelators of iron and their role in plant's iron management. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, *26*(8), 1541–1549. <https://doi.org/10.1007/s12298-020-00841-y>
- Dietz, S., Herz, K., Gorzolka, K., Jandt, U., Bruelheide, H., & Scheel, D. (2020). Root exudate composition of grass and forb species in natural grasslands. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54309-5>
- Ferreira, C. M. H., López-Rayó, S., Lucena, J. J., Soares, E. V., & Soares, H. M. V. M. (2019). Evaluation of the Efficacy of Two New Biotechnological-Based Freeze-Dried Fertilizers for Sustainable Fe Deficiency Correction of Soybean Plants Grown in Calcareous Soils. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01335>
- Gama, F. (2017). *Movimento e sinalização do ferro em plantas com estratégia I* [Doctor thesis, Universidade do Algarve]. Repositório da Universidade do Algarve. <https://sapientia.ualg.pt/handle/10400.1/10822>
- Hell, R., & Stephan, U. W. (2003). Iron uptake, trafficking and homeostasis in plants. *Planta*, *216*(4), 541–551. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0920-4>
- Jiménez, M. R., Casanova, L., Saavedra, T., Gama, F., Suárez, M. P., Correia, P. J., & Pestana, M. (2019). Responses of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants to iron deficiency in the root zone. *Folia Horticulturae*, *31*(1), 223–234. <https://doi.org/10.2478/fhort-2019-0017>
- Kratena, N., Gökler, T., Maltrovsky, L., Oburger, E., & Stanetty, C. (2021). A Unified

- Approach to Phytosiderophore Natural Products. *Chemistry - A European Journal*, 27(2), 577–580. <https://doi.org/10.1002/chem.202004004>
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148, 350–82. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)
- Lucena, J. J. (2003). Fe chelates for remediation of Fe chlorosis in strategy I plants. *Journal of Plant Nutrition*, 26(10–11), 1969–1984. <https://doi.org/10.1081/PLN-120024257>
- Lucena, J. J. (2006). Synthetic iron Chelates to correct iron deficiency in plants. *Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms*, 103–128. https://doi.org/10.1007/1-4020-4743-6_5
- Maxwell, K., & Johnson, N. (2000). Chlorophyll fluorescence—a practical guide Kate. *Journal of Experimental Botany*, 51(435), 659–668. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2018.02.001>
- Michel, L., Peña, Á., Pastenes, C., Berríos, P., Rombolà, A. D., & Covarrubias, J. I. (2019). Sustainable strategies to prevent iron deficiency, improve yield and berry composition in blueberry (*Vaccinium* spp.). *Frontiers in Plant Science*, 10, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00255>
- Mimmo, T., Del Buono, D., Terzano, R., Tomasi, N., Vigani, G., Crecchio, C., Cesco, S. (2014). Rhizospheric organic compounds in the soil-microorganism-plant system: Their role in iron availability. *European Journal of Soil Science*, 65(5), 629–642. <https://doi.org/10.1111/ejss.12158>
- Morales, F., Abadía, A., & Abadía, J. (1991). Chlorophyll fluorescence and photon yield of oxygen evolution in iron-deficient sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. *Plant Physiology*, 97(3), 886–893. <https://doi.org/10.1104/pp.97.3.886>
- Mori, S. (1999). Iron acquisition Satoshi Mori. *Current Opinion in Plant Biology*, 2, 250–253. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(99\)80043-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(99)80043-0)
- Murchie, E. H., & Lawson, T. (2013). Chlorophyll fluorescence analysis: A guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany*, 64(13), 3983–3998. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert208>
- Mustafa, A., Imran, M., Ashraf, M., & Mahmood, K. (2018). Perspectives of Using L-Tryptophan for Improving Productivity of Agricultural Crops: A Review. *Pedosphere*, 28(1), 16–34. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(18\)60002-5](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(18)60002-5)
- Parađiković, N., Teklić, T., Zeljković, S., Lisjak, M., & Špoljarević, M. (2019). Biostimulants research in some horticultural plant species—A review. *Food and Energy Security*, 8(2), 1–17. <https://doi.org/10.1002/fes3.162>
- Pestana, M. (2000). *Caracterização fisiológica e nutritiva da clorose férrica em citrinos* [Doctor thesis, Universidade do Algarve]. Repositório da Universidade do Algarve. <https://sapientia.ualg.pt/handle/10400.1/1029>
- Pestana, M., Correia, P., Saavedra, T., Gama, F., Abadía, A., & de Varennes, A. (2012). Development and recovery of iron deficiency by iron resupply to roots or leaves of strawberry plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 53, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.01.001>

- Pestana, M., De Varennes, A., & Correia, P. (2014). Clorose férrica induzida pelo calcário. *Revista Ceres*, *61*, 849–855. <https://doi.org/10.1590/0034-737X201461000010>
- Pestana, M., Domingos, I., Gama, F., Dandlen, S., Miguel, M., Castro Pinto, J., Correia, P. (2011). Strawberry recovers from iron chlorosis after foliar application of a grass-clipping extract. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, *174*(3), 473–479. <https://doi.org/10.1002/jpln.201000215>
- Pestana, M., & Varennes, A. (2004). Lime-induced Iron chlorosis in fruit trees. In *Plant mineral nutrition and pesticide management* (pp. 171–215). <https://doi.org/10.1007/1-4020-2536-x>
- Pestana, M., Varennes, A., & Faria, E. . (2003). Diagnosis and correction of iron chlorosis in fruit trees : a review. *Food, Agriculture & Environment*, *1*(1), 46–117.
- Povero, G., Mejia, J. F., Di Tommaso, D., Piaggese, A., & Warrior, P. (2016). A systematic approach to discover and characterize natural plant biostimulants. *Frontiers in Plant Science*, *7*, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00435>
- Ramirez-Garcia, J., Martens, H. J., Quemada, M., & Thorup-Kristensen, K. (2013). Intercropping effect on root growth and nitrogen uptake at different nitrogen levels. *Journal of Plant Ecology*, *8*(4), 380–389. <https://doi.org/10.1093/jpe/rtu024>
- Rasheed, F., Markgren, J., & Hedenqvist, M. (2020). Modeling to Understand Plant Protein. *Molecules*, *25*(4), 873–889.
- Ricci, M., Tilbury, L., Daridon, B., & Sukalac, K. (2019). General principles to justify plant biostimulant claims. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00494>
- Robinson, N. J., Procter, C. M., Connolly, E. L., & Guerinot, M. Lou. (1999). A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature*, *397*(6721), 694–697. <https://doi.org/10.1038/17800>
- Rombolà, A. D., & Tagliavini, M. (2006). Iron nutrition of fruit tree crops. *Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms*, 61–83. https://doi.org/10.1007/1-4020-4743-6_3
- Römheld, V., & Marschner, H. (1986). Evidence for a Specific Uptake System for Iron Phytosiderophores in Roots of Grasses. *Plant Physiology*, *80*(1), 175–180. <https://doi.org/10.1104/pp.80.1.175>
- Saavedra, T., Gama, F., Correia, P. J., Da Silva, J. P., Miguel, M. G., de Varennes, A., & Pestana, M. (2020). A novel plant extract as a biostimulant to recover strawberry plants from iron chlorosis. *Journal of Plant Nutrition*, *43*(13), 2054–2066. <https://doi.org/10.1080/01904167.2020.1766079>
- Sadeghzadeh, N., Hajiboland, R., Moradtalab, N., & Poschenrieder, C. (2021). Growth enhancement of Brassica napus under both deficient and adequate iron supply by intercropping with Hordeum vulgare: a hydroponic study. *Plant Biosystems*, *155*(3), 632–646. <https://doi.org/10.1080/11263504.2020.1769215>
- Schmidt, W. (2003). Iron homeostasis in plants: Sensing and signaling pathways. *Journal of Plant Nutrition*, *26*(10–11), 2211–2230. <https://doi.org/10.1081/PLN-120024276>

- Schwertmann, U. (1991). Solubility and dissolution of iron oxides. *Plant and Soil*, *130*(1), 1–25. <https://doi.org/10.1007/BF00011851>
- Stringlis, I. A., De Jonge, R., & Pieterse, C. M. J. (2019). The Age of Coumarins in Plant-Microbe Interactions. *Plant and Cell Physiology*, *60*(7), 1405–1419. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcz076>
- Suzuki, M., Urabe, A., Sasaki, S., Tsugawa, R., Nishio, S., Mukaiyama, H., Namba, K. (2021). Development of a mugineic acid family phytosiderophore analog as an iron fertilizer. *Nature Communications*, *12*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21837-6>
- Takahashi, M., Terada, Y., Nakai, I., Nakanishi, H., Yoshimura, E., Mori, S., & Nishizawa, N. K. (2003). Role of nicotianamine in the intracellular delivery of metals and plant reproductive development. *Plant Cell*, *15*(6), 1263–1280. <https://doi.org/10.1105/tpc.010256>
- Tsai, H. H., & Schmidt, W. (2017). Mobilization of Iron by Plant-Borne Coumarins. *Trends in Plant Science*, *22*(6), 538–548. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.03.008>
- Tsimogiannis, D., & Oreopoulou, V. (2019). Classification of Phenolic Compounds in Plants. *Polyphenols in Plants*, 263–284. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813768-0.00026-8>
- Van Oosten, M. J., Pepe, O., De Pascale, S., Silletti, S., & Maggio, A. (2017). The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, *4*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s40538-017-0089-5>
- Vernon L., Rudolf, R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Polyphenols and Flavonoids* (Vol. 299). <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.11.004>
- Vose, P. B. (1982). Iron nutrition in plants: A world overview. *Journal of Plant Nutrition*, *5*(4–7), 233–249. <https://doi.org/10.1080/01904168209362954>
- Wang, Y., Qin, Y., Chai, Q., Feng, F., Zhao, C., & Yu, A. (2018). Interspecies interactions in relation to root distribution across the rooting profile in wheat-maize intercropping under different plant densities. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00483>
- Ward, J. T., Lahner, B., Yakubova, E., Salt, D. E., & Raghothama, K. G. (2008). The effect of iron on the primary root elongation of Arabidopsis during phosphate deficiency. *Plant Physiology*, *147*(3), 1181–1191. <https://doi.org/10.1104/pp.108.118562>
- Yoneyama, T. (2021). Iron delivery to the growing leaves associated with leaf chlorosis in mugineic acid family phytosiderophores-generating graminaceous crops. *Soil Science and Plant Nutrition*, *67*(4), 415–426. <https://doi.org/10.1080/00380768.2021.1947735>
- Zhang, L., Li, X., Zuo, W., Li, S., Sun, G., Wang, W., ... Huang, H. (2021). Root exuded low-molecular-weight organic acids affected the phenanthrene degrader differently: A multi-omics study. *Journal of Hazardous Materials*, *414*, 125367.

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125367>

Zhao, S., Liu, J. Y., Chen, S. Y., Shi, L. L., Liu, Y. J., & Ma, C. (2011). Antioxidant potential of polyphenols and tannins from burs of *Castanea mollissima* Blume. *Molecules*, *16*(10), 8590–8600. <https://doi.org/10.3390/molecules16108590>

Zuo, Y., & Zhang, F. (2009). Iron and zinc biofortification strategies in dicot plants by intercropping with gramineous species: A review. *Sustainable Agriculture*, *29*, 571–582. https://doi.org/10.1007/978-90-481-2666-8_35