

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**SELÊNIO NO DESEMPENHO FISIOLÓGICO E
BIOFORTIFICAÇÃO AGRONÔMICA DA COUVE-FLOR**

Alexson Filgueiras Dutra

Licenciado em Ciências Agrárias

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**SELÊNIO NO DESEMPENHO FISIOLÓGICO E
BIOFORTIFICAÇÃO AGRONÔMICA DA COUVE-FLOR**

Alexson Filgueiras Dutra

Orientador: Prof. Dr. Arthur Bernardes Cecílio Filho

Coorientadora: Profa. Dra. Priscila Lupino Gratão

Coorientador: Dr. Hilário Júnior de Almeida

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Ciência do Solo).

2017

D978s Dutra, Alexson Filgueiras
Selênio no desempenho fisiológico e biofortificação agrônômica da couve-flor / Alexson Filgueiras Dutra. -- Jaboticabal, 2017
xvi, 81 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017
Orientador: Arthur Bernardes Cecílio Filho
Banca examinadora: André Rodrigues dos Reis, Rogério Falleiros Carvalho, Jairo Osvaldo Cazetta, Roberto Botelho Ferraz Branco

Bibliografia

1. *Brassica oleracea* var. *botytis*. 2. Selenato. 3. Selenito. 4. Macronutrientes. 5. Fotossíntese. 6. Enzimas antioxidantes. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.4:635.35

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: SELÊNIO NO DESEMPENHO FISIOLÓGICO E BIOFORTIFICAÇÃO AGRONÔMICA DA COUVE-FLOR

AUTOR: ALEXSON FILGUEIRAS DUTRA
ORIENTADOR: ARTHUR BERNARDES CECILIO FILHO
COORIENTADORA: PRISCILA LUPINO GRATÃO
COORIENTADOR: HILÁRIO JÚNIOR DE ALMEIDA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA (CIÊNCIA DO SOLO), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ARTHUR BERNARDES CECILIO FILHO
 Departamento de Produção Vegetal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. ANDRÉ RODRIGUES DOS REIS
 Coordenadoria do Curso de Engenharia de Biosistemas / Faculdade de Ciências e Engenharia - FCE - UNESP - Tupã/SP

Prof. Dr. ROGÉRIO FALLEIROS CARVALHO
 Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. JÁIRO OSVALDO CAZETTA
 Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Pesquisador Dr. ROBERTO BOTELHO FERRAZ BRANCO
 APTA - Polo Regional do Centro Leste / Ribeirão Preto/SP

Jaboticabal, 16 de novembro de 2017

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ALEXSON FILGUEIRAS DUTRA - nascido em 28 de maio de 1989 na cidade de Brejo do Cruz - PB, filho de Joseni Filgueiras Dutra e Genilson Dutra de Sousa. Concluiu o segundo grau em 2006 no Centro Educacional Ciranda do Saber na cidade de Brejo do Cruz - PB. No ano seguinte, ingressou no curso superior de Licenciatura em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), campus de Catolé do Rocha - PB, onde participou, durante o curso, de projetos de iniciação científica e atuou como monitor das disciplinas Matemática Aplicada (2008) e Fruticultura (2009). Em junho de 2010, concluiu o curso de Licenciatura em Ciências Agrárias sob orientação do Prof. Dr. Alberto Soares de Melo e, em seguida, ingressou no Mestrado em Ciências Agrárias pela Universidade Estadual da Paraíba em parceria com a Embrapa Algodão (Campina Grande - PB), concluindo-o em julho de 2012 sob a orientação do Prof. Dr. Alberto Soares de Melo e coorientação do saudoso Prof. Dr. Napoleão Esberard de Macêdo Beltrão. Em 2014 tornou-se aluno de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Ciência do Solo) pela Universidade Estadual Paulista, campus de Jaboticabal (FCAV/UNESP), sendo orientado pelo Prof. Dr. Arthur Bernardes Cecílio Filho e coorientado pela Profa. Dra. Priscila Lupino Gratão e pelo Dr. Hilário Júnior de Almeida, vindo a obter o título de doutor em Agronomia (Ciência do Solo) em novembro de 2017.

Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.

Madre Tereza de Calcutá

Ao fim de uma jornada, sempre tenha a humildade de agradecer a todos que fizeram a caminhada mais prazerosa. A gratidão é a inteligência do sábio.

Andresa Wrielly Filgueiras Dutra

Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Não importa quais sejam os obstáculos e as dificuldades. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.

Dalai Lama

A DEUS, por me dar forças e me guiar espiritualmente para vencer mais essa etapa.

A minha Família, especialmente aos meus pais Genilson Dutra de Sousa e Joseni Filgueiras Dutra, e meus irmãos Wellison Filgueiras Dutra e Andresa Wrielly Filgueiras Dutra, que mesmo distante, sempre me deu força, incentivo, carinho e amor em todos os momentos. Não esquecerei todo apoio!

A Alcilene de Sousa Silva, pelo companheirismo, apoio, dedicação e cuidado durante essa caminhada, o que foi fundamental para essa conquista.

DEDICO

Aos meus avôs *in memoriam*, Francisco Fernandes Filgueiras (Chiquinho), Francisca Fernandes Filgueiras (Chiquinha) e Pedro Belino de Sousa (Pedro Belém), que foram exemplos de humildade, coragem e perseverança, e com seus conselhos deixaram bons ensinamentos.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

É difícil descrever em palavras a imensa alegria que sinto por conseguir concluir esta etapa. Não foi uma jornada fácil, no entanto, tenho certeza que teria sido bem mais difícil se não houvesse inúmeras pessoas ao meu lado. Por este motivo quero agradecer de todo coração:

Primeiramente a Deus, pela vida e por estar sempre guiando meus passos e me mostrando que todo esforço vale a pena. Por me fortalecer e mostrar-me superação diante das dificuldades.

Aos meus pais (Genilson e Joseni) e irmãos (Wellison e Andresa) pelo amor incondicional e por sempre apoiarem minhas decisões e acreditarem em mim.

A Alcilene, por todo amor, carinho e atenção nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Arthur Bernardes Cecílio Filho, pela valiosa orientação, amizade adquirida, pelo acolhimento, atenção, convivência harmoniosa, confiança e, acima de tudo, pelos valiosos ensinamentos durante essa jornada e contribuições para o meu crescimento pessoal e profissional.

A minha coorientadora, Profa. Dra. Priscila Lupino Gratão, pelas contribuições, orientação, atenção e parceria que nos possibilitou a realização das análises bioquímicas em laboratório.

Ao meu coorientador, Dr. Hilário Júnior de Almeida, pela orientação, ensinamentos, amizade e dedicação em todas as etapas do trabalho, sempre exigindo e incentivando o meu potencial máximo.

Ao meu grande amigo Lucas Eduardo de Oliveira Aparecido, um irmão que Deus me deu durante estes anos de doutorado. Obrigado por todo apoio.

Ao meu grande amigo Rodrigo Hiyoshi Dalmazzo Nowaki, pelas risadas, amizade sincera, apoio e distração nos momentos difíceis.

Aos meus amigos Lucas Aparecido, Claudio Ferreira e Sérgio Rugeles, pela amizade e agradável convivência durante o período em que dividimos apartamento.

Aos meus amigos, Rodolfo Gustavo Teixeira Ribas e Leonardo Correia Costa, que sempre estiveram presentes ajudando nas etapas do experimento e nas análises de laboratório.

Aos amigos Lucas, Robson Medeiros, Gustavo e Patrick, que sempre me acolheram da melhor forma possível em seu apartamento.

Aos amigos do grupo de pesquisa em nutrição de hortaliças, Rodrigo Hiyoshi Dalmazzo Nowaki, Rodolfo Gustavo Teixeira Ribas, Leonardo Correia Costa, Matheus Saraiva Bianco, Eliza Barbosa, Natalia Barreto, Juan Waldir Mendoza Cortez, Tatiana Pagan, Victor Manuel Vergara Carmona, pelas experiências compartilhadas, apoio e aqueles momentos de descontração.

Aos amigos conterrâneos da Paraíba pelo apoio de sempre.

A todos os meus amigos dentro e fora da Universidade.

Aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal (Horticultura) pela simpatia, afeição e assistência.

As funcionárias de laboratório, Sônia e Sidnéia, pelas orientações e ajuda nas análises laboratoriais.

Aos funcionários de campo da Horta, Inauro, Cláudio e Reinaldo, que sempre estiveram disponíveis para ajudar nas atividades de condução do experimento.

Ao programa de Pós-Graduação em Agronomia (Ciência do Solo) da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, campus de Jaboticabal-SP, pela oportunidade.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES, pelo auxílio financeiro concedido para realização do curso de doutorado.

A todos os professores que contribuíram para minha formação pessoal e profissional, e a todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram para a conclusão deste trabalho e que por ventura não mencionei, meu sincero agradecimento.

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

RESUMO.....	XI
ABSTRACT	XII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
LISTA DE TABELAS	XIV
LISTA DE FIGURAS	XV
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1.1 INTRODUÇÃO.....	1
1.2 REVISÃO DE LITERATURA	3
1.2.1 Selênio e sua importância na biofortificação	3
1.2.2 Aspectos bioquímicos, fisiológicos e nutricionais do selênio nas plantas...7	
1.3 REFERÊNCIAS	10
CAPÍTULO 2 – BIOFORTIFICAÇÃO DA COUVE-FLOR COM SELÊNIO E SEU EFEITO NO CRESCIMENTO E ACÚMULO DE NUTRIENTES.....	16
2.1 INTRODUÇÃO.....	17
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
2.2.1 Localização e caracterização da área experimental.....	19
2.2.2 Instalação e condução do experimento	19
2.2.3 Tratamentos e delineamento experimental	20
2.2.4 Características avaliadas	20
2.2.5 Análise estatística.....	22
2.3 RESULTADOS	22
2.3.1 Teor e acúmulo de Se	22
2.3.2 Teor de nutrientes na folha diagnóstica.....	26
2.3.3 Teor e acúmulo de nutrientes na inflorescência	32
2.3.4 Partição de massa seca e massa da inflorescência.....	40
2.3.5 Índices de eficiência	43
2.4 DISCUSSÃO.....	44
2.5 CONCLUSÕES.....	48
2.6 REFERÊNCIAS	48

CAPÍTULO 3 – AUMENTO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM PLANTAS DE COUVE-FLOR BIOFORTIFICADAS COM SELÊNIO.....	52
3.1 INTRODUÇÃO.....	53
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	55
3.2.1 Localização, instalação e condução do experimento	55
3.2.2 Características avaliadas	56
3.2.3 Análise estatística.....	60
3.3 RESULTADOS	60
3.3.1 Massa seca total e teor de Se	60
3.3.2 Análise de trocas gasosas.....	62
3.3.3 Peroxidação lipídica e teor de H ₂ O ₂	65
3.3.4 Teor de clorofila e carotenóides	68
3.3.5 Atividade de enzimas antioxidantes	69
3.4 DISCUSSÃO.....	73
3.5 CONCLUSÕES.....	77
3.6 REFERÊNCIAS	78

SELÊNIO NO DESEMPENHO FISIOLÓGICO E BIOFORTIFICAÇÃO AGRONÔMICA DA COUVE-FLOR

RESUMO - O selênio (Se) é um elemento essencial para os seres humanos, no entanto, em plantas é considerado benéfico. O Se pode atuar como antioxidante de células vegetais, melhorando o crescimento das plantas. A aplicação de Se em culturas para fins de biofortificação tem sido uma estratégia eficaz para aumentar o fornecimento do elemento na dieta da população. Entretanto, para ter sucesso é fundamental estudar a aplicação de Se, conhecendo a fonte e concentração adequadas, de forma que não prejudique o crescimento, os aspectos nutricionais, bioquímicos e produtivos da planta. Assim, objetivou-se avaliar o efeito de fontes e concentrações de Se na biofortificação e aspectos nutricionais, fisiológicos e enzimáticos de plantas de couve-flor. O estudo foi realizado em ambiente protegido, com plantas de couve-flor cultivadas em sistema hidropônico, sob concentrações de Se (0, 5, 15, 30 e 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$) nas fontes selenato e selenito de sódio. Os tratamentos foram organizados em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 2, com quatro repetições. Verificou-se que a aplicação de Se na concentração de 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ na solução nutritiva promoveu crescimento das plantas e teor do elemento na inflorescência da couve-flor foi superior ao limite considerado adequado pelo *Codex Alimentarius*. O fornecimento de Se, na fonte selenato, pode ter contribuído para inibir a peroxidação lipídica e a produção de espécies reativas de oxigênio, uma vez que com esse elemento houve melhora na taxa de fotossíntese e na regulação da atividade enzimática das plantas. Em altas concentrações, o Se fornecido principalmente na fonte selenito, afeta negativamente o equilíbrio nutricional das plantas e, em consequência, o crescimento, os aspectos fisiológicos, enzimáticos e produtivos da couve-flor, depreciando a qualidade do produto.

Palavras-chave: *Brassica oleracea* var. *botrytis*, selenato, selenito, macronutrientes, fotossíntese, enzimas antioxidantes

SELENIUM IN PHYSIOLOGICAL PERFORMANCE AND BIOFORTIFICATION AGRONOMIC OF CAULIFLOWER

ABSTRACT – Selenium (Se) is an essential element for humans, however, in plants is considered beneficial. The Se can act as an antioxidant of plant cells, improving plant growth. The application of Se in crops for biofortification has been an effective strategy to increase the supply of the element in the diet of the population. However, to be successful, it is essential to study the application of Se, knowing the proper source and concentration, so as not to harm the growth, nutritional, biochemical and productive aspects of the plant. Thus, objective was evaluate the effect of sources and concentrations of Se on biofortification and nutritional, physiological and enzymatic aspects of cauliflower plants. The study was carried out in a protected environment, with cauliflower plants cultivated in a hydroponic system, under concentrations of Se (0, 5, 15, 30 and 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$) in sources selenate and selenite sodium. The treatments were organized in a completely randomized design, in factorial scheme 5 x 2, with four replications. It was verified that the application of Se at the concentration of 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ in the nutritive solution promoted plant growth and element content in the cauliflower inflorescence was higher than the limit considered adequate by the *Codex Alimentarius*. The supply of exits at the selenate source may have contributed to inhibit a lipid peroxidation and a production of reactive oxygen species, since this element is an improvement in the rate of photosynthesis and the regulation of the enzymatic activity of plants. At high concentrations, if supplied mainly in the selenite source, it adversely affects the nutritional balance of plants and, consequently, the growth, the physiological, enzymatic and productive aspects of the cauliflower, depreciating a quality of the product.

Keywords: *Brassica oleracea* var. *botrytis*, selenate, selenite, macronutrients, photosynthesis, antioxidant enzymes

Lista de Abreviaturas

Se – selênio

SeO_4^{2-} – selenato

SeO_3^{2-} – selenito

DAS – dias após semeadura

NFT – nutrient film technique

PVC – policlorito de polivinila

MFI – massa fresca da inflorescência

MSR – massa seca da raiz

MSC – massa seca do caule

MSF – massa seca das folhas

MSI – massa seca da inflorescência

EDXRF – energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry

ERO – espécies reativas de oxigênio

$\text{OH}\cdot$ – radical hidroxila

$\text{O}_2^{\cdot-}$ – superóxido

H_2O_2 – peróxido de hidrogênio

C_i – concentração interna de CO_2

E – taxa de transpiração

g_s – condutância estomática

A – taxa de fotossíntese

MDA – malondialdeído

SOD – superóxido dismutase

CAT – catalase

GPX – glutathione peroxidase

GR – glutathione reductase

APX – ascorbate peroxidase

Lista de Tabelas

Capítulo 2

Tabela 1. Resumo da análise de variância para teor de Se na folha diagnóstica (FD), na raiz, folha, caule e inflorescência da couve-flor no final do ciclo em função de fontes e concentrações de Se.....23

Tabela 2. Resumo da análise de variância para acúmulo de Se na raiz, folha, caule e inflorescência da couve-flor no final do ciclo em função de fontes e concentrações de Se.....25

Tabela 3. Resumo da análise de variância para teor de macronutrientes na folha diagnóstica da couve-flor em função de fontes e concentrações de Se.....27

Tabela 4. Resumo da análise de variância para teor de micronutrientes na folha diagnóstica da couve-flor em função de fontes e concentrações de Se.....29

Tabela 5. Resumo da análise de variância para teor de nutrientes na inflorescência da couve-flor em função de fontes e concentrações de Se.....33

Tabela 6. Resumo da análise de variância para acúmulo de nutrientes na inflorescência da couve-flor em função de fontes e concentrações de Se.....37

Tabela 7. Resumo da análise de variância para massa seca de raiz, folha, caule e inflorescência e massa fresca da inflorescência de plantas de couve-flor em função de fontes e concentrações de Se.....41

Capítulo 3

Tabela 1. Resumo da análise de variância para concentração interna de CO₂ (C_i), taxa de transpiração (E), condutância estomática (g_s) e taxa de fotossíntese (A) em folhas de couve-flor aos 75 e 90 dias após semeadura (DAS) em função de fontes (● selenato; ○ selenito) e concentrações de Se.....63

Tabela 2. Resumo da análise de variância para teor de malondialdeído (MDA) e de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em folhas aos 75 e 90 DAS e na inflorescência da couve-flor (INF), teor de clorofila total (ClOT) e carotenóides (Car) em folhas de couve-flor aos 75 e 90 DAS em função de fontes (● selenato; ○ selenito) e concentrações de Se.....67

Tabela 3. Resumo da análise de variância para as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona redutase (GR) e ascorbato peroxidase (APX) em folhas de couve-flor aos 75 e 90 DAS e na inflorescência (INF) de couve-flor em função de fontes (● selenato; ○ selenito) e concentrações de Se.....71

Lista de Figuras

Capítulo 2

- Figura 1. Teor de Se na folha diagnóstica de couve-flor em função de fontes (● selenato; ○ selenito) e concentrações de Se.....24
- Figura 2. Efeito das concentrações de Se no teor (A) e acúmulo de Se (C) na fonte selenato, e teor (B) e acúmulo de Se (D) na fonte selenito, em raiz (Δ), caule (∇), folha (○) e inflorescência (●) de couve-flor em solução nutritiva.....26
- Figura 3. Efeito das concentrações e fontes de Se (● selenato; ○ selenito) no teor de macronutrientes na folha diagnóstica de couve-flor cultivada em solução nutritiva. .28
- Figura 4. Efeito das concentrações e fontes de Se (● selenato; ○ selenito) no teor de micronutrientes na folha diagnóstica de couve-flor cultivada em solução nutritiva. ♦ Média entre as fontes de Se.....31
- Figura 5. Teor de nutrientes na inflorescência de couve-flor em função de fontes (● selenato; ○ selenito) e concentrações de Se. ♦ Média entre as fontes de Se.35
- Figura 6. Acúmulo de macronutrientes na inflorescência de couve-flor em função de fontes (● selenato; ○ selenito) e concentrações de Se. ♦ Média entre as fontes de Se.38
- Figura 7. Acúmulo de micronutrientes na inflorescência de couve-flor em função de fontes (● selenato; ○ selenito) e concentrações de Se. ♦ Média entre as fontes de Se.40
- Figura 8. Efeito das concentrações e fontes de Se (● selenato; ○ selenito) na massa seca das partes da planta e massa fresca da inflorescência de couve-flor cultivada em solução nutritiva. ♦ Média entre as fontes de Se.42
- Figura 9. Eficiência de absorção de Se – EA_{Se} (A) e translocação de Se – ET_{Se} (B) na planta e eficiência de utilização de Se na inflorescência – EU_{Se} (C) de couve-flor em função de fontes (● selenato; ○ selenito) e concentrações de Se.....43

Capítulo 3

- Figura 1. Efeito das concentrações de Se na massa seca total da couve-flor na fonte selenato (A) e selenito (B) e teor de selênio nas partes da couve-flor na fonte selenato (C) e selenito (D).....61

Figura 2. Quantificação da concentração interna de CO₂ (Ci) e condutância estomática (gs) aos 75 DAS e taxa de fotossíntese (A) aos 75 e 90 DAS em folhas de couve-flor em função de fontes (● selenato; ○ selenito) e concentrações de Se.65

Figura 3. Peroxidação lipídica pela quantificação do teor de malondialdeído (MDA) nas folhas aos 75 DAS (A) e 90 DAS (B) e na inflorescência da couve-flor (C) e teor de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) mensurado na inflorescência de plantas de couve-flor (D) em função de fontes (● selenato; ○ selenito) e concentrações de Se.68

Figura 4. Teor de clorofila total e carotenóides em folhas de couve-flor aos 75 e 90 DAS em função de fontes (● selenato; ○ selenito) e concentrações de Se.69

Figura 5. Atividade específica das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona redutase (GR) e ascorbato peroxidase (APX) em folhas de couve-flor aos 75 e 90 DAS em função de fontes (● selenato; ○ selenito) e concentrações de Se. ♦ Média entre as fontes de Se.72

Figura 6. Atividade da superóxido dismutase (SOD) na inflorescência de plantas de couve-flor em função de fontes (● selenato; ○ selenito) e concentrações de Se.73

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1.1 INTRODUÇÃO

O selênio (Se) é um elemento essencial ao metabolismo humano e animal, principalmente por atuar como componente de diversas enzimas e proteínas (ÁVILA et al., 2013; KAUR; SHARMA; NAYYAR, 2014). Sua função no organismo é exercida, especialmente por selenoproteínas, como glutathione peroxidases e tioredoxina reductases, que possuem diversas funções, incluindo proteção contra danos oxidativos e regulação do estado redox intracelular (FAIRWEATHER-TAIT; COLLINGS; HURST, 2010). A ingestão de Se em níveis adequados além de prevenir o desenvolvimento de doenças, como doença de Keshan e Kashin-Beck, contribui para redução na incidência de cânceres no organismo humano (FAIRWEATHER-TAIT et al., 2011; JEŽEK et al., 2012). Para o bem-estar das pessoas, recomenda-se a ingestão de Se entre 55 e 400 $\mu\text{g dia}^{-1}$, sendo esse intervalo considerado estreito entre deficiência e toxicidade (FAIRWEATHER-TAIT et al., 2011; MORA et al., 2015; WHITE, 2016).

A ingestão de Se através da alimentação é a principal forma de atender a demanda desse nutriente no corpo. No entanto, a concentração desse elemento nos alimentos de origem vegetal é considerada baixa, o que está relacionado, em grande parte, com a baixa disponibilidade de Se no solo (FERREIRA et al., 2002; WHITE; BROADLEY, 2009). Este fato é encontrado em diversos países como Estados Unidos, Reino Unido, China, Finlândia e Nova Zelândia, em que a deficiência de Se na nutrição humana têm sido relatada e associada com o baixo teor de Se nos alimentos (WHITE; BROADLEY, 2009), tornando-se um problema de caráter nutricional que atinge cerca de 15% da população mundial (HAWRYLAK-NOWAK, 2013; GUERRERO et al., 2014).

Uma das estratégias que têm sido promissora em combater a deficiência e aumentar a ingestão de Se pela população envolve a técnica de biofortificação de plantas com Se (WHITE; BROADLEY, 2009; MALAGOLI et al., 2015; BAÑUELOS et al., 2016). Este método permite aumentar a transferência desse elemento do solo para as plantas, enriquecendo os produtos com Se e incrementando-os na cadeia alimentar (BROADLEY et al., 2006; WHITE; BROADLEY, 2009; WINKEL et al., 2015). Esta

abordagem tem sido efetiva na Finlândia, em que o aumento da concentração de Se nos alimentos, por meio da adubação e/ou melhoramento genético das culturas, proporcionou aumento da concentração de Se no plasma sanguíneo da população e reduziu a incidência de cânceres e doenças cardiovasculares (BROADLEY et al., 2006; KAUR; SHARMA; NAYYAR, 2014).

Em plantas, a essencialidade do Se ainda não é um fato concreto. Entretanto, estudos relatam efeitos benéficos do Se em baixas concentrações, promovendo o crescimento e auxiliando as plantas a se manterem por mais tempo fisiologicamente ativas (RAMOS et al., 2011a; RIOS et al., 2013; HAWRYLAK-NOWAK; MATRASZEK; POGORZELEC, 2015), aumentando a atividade fotossintética e produtividade das culturas (ZHANG et al., 2014; FENG et al., 2015), redução de danos oxidativos e melhoria na atividade enzimática (DJANAGUIRAMAN et al., 2005; DJANAGUIRAMAN; PRASAD; SEPPANEN, 2010; RAMOS et al., 2010; CASTILLO-GODINA; FOROUGHBAKHCH-POURNAVAB; BENAVIDES-MENDOZA, 2016).

A capacidade de absorção e acúmulo de Se pelas plantas varia com a forma de Se disponível na solução do solo, podendo ser encontrado nas formas inorgânicas, orgânicas e elementar (TERRY et al., 2000; HAWRYLAK-NOWAK, 2013; KAUR; SHARMA; NAYYAR, 2014). As raízes podem absorver Se, principalmente nas formas de selenato, selenito ou compostos orgânicos. O selenato é transportado através da membrana plasmática por transportadores de sulfato de alta afinidade, sendo facilmente translocado para parte aérea das plantas, enquanto o selenito é transportado por transportadores de fosfato (WHITE; BROADLEY, 2009). O Se absorvido na forma de selenato pelas plantas apresenta propriedades químicas semelhantes às do enxofre (S), partilhando de vias metabólicas em comum e competindo por processos metabólicos responsáveis pelo desenvolvimento e crescimento das plantas (SORS; ELLIS; SALT, 2005; MALAGOLI et al., 2015).

Em várias regiões do Brasil são grandes as evidências de deficiência de Se na população (FERREIRA et al., 2002; REIS et al., 2014), fato que pode estar relacionado com os teores desse elemento no solo, uma vez que há fortes evidências indicando deficiência de Se em solos brasileiros (GABOS et al., 2014; REIS et al., 2014). Em solos do Estado de São Paulo têm-se registrado teores de Se em média de 0,19 mg kg⁻¹ (GABOS et al., 2014), teor considerado abaixo do limite de deficiência (< 0,6 mg

kg⁻¹) (LYONS et al., 2003). Nesse contexto, a couve-flor, por ser uma brássica amplamente cultivada e consumida no Brasil, principalmente no estado de São Paulo, é uma hortaliça recomendável a integrar programas de biofortificação de Se, sobretudo, em vista dos baixos teores de Se encontrados nesta hortaliça comercializada no Brasil, de 0,002 a 0,013 mg kg⁻¹ Se (FERREIRA et al., 2002). Assim, diante do exposto e considerada a escassez de informações no Brasil sobre biofortificação de Se em hortaliças, objetivou-se avaliar o efeito de fontes e concentrações de Se na biofortificação e nos aspectos nutricionais, fisiológicos e enzimáticos de plantas de couve-flor.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 Selênio e sua importância na biofortificação

Estudos relacionados à segurança alimentar têm ganhado destaque na literatura nacional e internacional, principalmente com relação a benefícios ligados à saúde do ser humano e as melhorias na sua nutrição básica. O Se além de ser um elemento traço, importante e essencial para o ser humano e os animais devido seu valor nutricional, é fonte de estudos de interesse em vários países por ser relevante na nutrição e alimentação, levando em consideração suas propriedades anticancerígenas e antioxidantes, principalmente dentro dos programas de biofortificação em diferentes tipos de alimentos e culturas (WHITE, 2016).

Nos organismos que consomem principalmente uma dieta baseada em plantas, os problemas de saúde relacionados à deficiência de Se podem surgir devido à distribuição variante desse elemento no solo e sua absorção moderada pelas culturas. Fato constatado em diversas partes do mundo e que torna-se um problema de caráter nutricional associado a uma dieta com ingestão de Se abaixo da adequada, atingindo cerca de 15% da população mundial (HAWRYLAK-NOWAK, 2013; GUERRERO et al., 2014).

Uma vez que as baixas concentrações de Se no solo, em suas formas disponíveis para as plantas, podem diminuir a ingestão dietética de Se, é de grande importância melhorar a biodisponibilidade de Se e aumentar seu teor nas partes

comestíveis das plantas cultivadas em áreas deficientes de Se. Portanto, as estratégias de manejo destinadas a minimizar a deficiência de Se e os distúrbios relacionados à dieta devem se concentrar no estabelecimento de uma conexão entre os produtos alimentares agrícolas e o teor de Se e a disponibilidade no solo (WINKEL et al., 2015). Nesse sentido, em diversos países, como China, Finlândia e Reino Unido, estratégias para a ingestão de Se vêm sendo estudadas e, entre elas, destaca-se a biofortificação de plantas, que é definida como o processo de aumento da concentração biodisponível de elementos essenciais e benéficos aos seres humanos e animais em partes comestíveis das plantas por meio da intervenção agrícola ou seleção genética (WHITE; BROADLEY, 2009).

A biofortificação com Se permite inserir esse elemento na cadeia alimentar humana e animal, uma vez que as plantas atuam de forma eficiente no controle da ingestão excessiva (HARTIKAINEN, 2005) e não acumula Se em teores tóxicos nas partes comestíveis das plantas. Ainda, a biofortificação em plantas por meio da fertilização com Se, seja via foliar ou aplicação direta no solo, apresenta potencial para fornecer benefícios contínuos, ano após ano, a um custo menor e mais eficiente que o uso de suplementos alimentares e da fortificação de produtos pós-colheita nas indústrias (WHITE, 2016; PUCCINELLI; MALORGIO; PEZZAROSSA, 2017).

As plantas apresentam capacidades diferenciadas de absorção e acúmulo de Se, sendo possível absorver esse elemento principalmente nas formas de selenato (SeO_4^{2-}) e selenito (SeO_3^{2-}), embora possa também ser absorvido como selênio elementar (Se^0), seleneto (Se^{2-}) e formas orgânicas de Se (SORS; ELLIS; SALT, 2005; WHITE; BROADLEY, 2009). O Se, ao ser absorvido pelas plantas na forma de selenato, apresenta propriedades químicas semelhantes às do enxofre (S), sendo compartilhadas as mesmas vias metabólicas. A presença de compostos isólogos nas plantas indica que o Se e S competem em processos biológicos que afetam a absorção, translocação e assimilação nos processos de crescimento das plantas (SORS; ELLIS; SALT, 2005). O Se na forma de selenato é prontamente absorvido pelas plantas através dos transportadores de sulfato e devido às suas semelhanças químicas, Se e o S, competem pelos mesmos transportadores, sendo a absorção de Se geralmente limitada por altos níveis de S (MALAGOLI et al., 2015).

Apesar de ainda não ser considerado um nutriente para as plantas, o Se têm sido classificado como um elemento benéfico, contribuindo para o crescimento e qualidade das plantas devido aos seus efeitos antioxidantes (WHITE, 2016). Os teores de Se nas plantas, animais e seres humanos, numa determinada região, estão diretamente relacionados com o conteúdo desse elemento no solo, que por sua vez está relacionado com a pedologia, gênese e localização das áreas de cultivo, tendo as plantas um papel essencial na transferência do Se do solo para a cadeia alimentar (WHITE et al., 2004; SORS; ELLIS; SALT, 2005; WHITE; BROADLEY, 2009).

A adição de Se à mistura de fertilizantes, como maneira de suprir sua necessidade em solos com baixos teores deste elemento e incrementar sua concentração nas plantas, é relativamente recente. A primeira tentativa foi realizada por Cary e Allaway (1973) ao aplicarem selenito de sódio nas doses de 2,24 e 4,48 kg ha⁻¹ em campos de milho, aveia e forragem, que apresentaram concentrações de Se no tecido vegetal acima de 0,1 mg kg⁻¹, sendo o suficiente para proteger os animais de doenças causadas pela deficiência de Se. Estes autores verificaram ainda que a aplicação da dose de 4,48 kg ha⁻¹ não acarretou em teores de Se considerados tóxicos, concluindo que a adição de Se na fonte de selenito de sódio, na dose de 2 kg ha⁻¹, foi suficiente para o enriquecimento das plantas com Se, protegendo os animais da deficiência deste mineral.

Em decorrência do aumento nos casos de câncer e problemas cardíacos na população, em 1984, o Ministério de Agricultura e Florestas da Finlândia iniciou a suplementação de plantas com fertilizantes minerais contendo Se na fonte de selenato de sódio. A princípio, a suplementação de Se foi constituída de 16 mg kg⁻¹ para cereais e hortaliças e de 6 mg kg⁻¹ para pastagens. Após diversas pesquisas, foi estipulado em 10 mg kg⁻¹ o teor de Se em fertilizantes (JEŽEK et al., 2012; KAUR; SHARMA; NAYYAR, 2014). Essa suplementação aumentou os teores de Se no solo, e em consequência incrementou o nível desse elemento nos alimentos, ficando dentro dos limites considerados seguros e adequados para o consumo humano, além de incrementar a produção das culturas (HARTIKAINEN, 2005). Com este programa, a média de ingestão de Se na Finlândia aumentou de 25 µg dia⁻¹ para 110 µg dia⁻¹ e a concentração do nutriente no plasma sanguíneo quase duplicou (JEŽEK et al., 2012),

o que contribuiu para redução dos índices de doenças cardiovasculares, imunológicas e inúmeros tipos de câncer na população (ARTHUR, 2003).

No Brasil, trabalhos dessa natureza ainda são escassos, apesar de existir fortes evidências de baixo consumo de Se pela população brasileira, principalmente nos grupos de baixo poder aquisitivo, os quais não consomem produtos de origem animal com frequência, podendo ocorrer deficiência de Se no organismo (FERREIRA et al., 2002; REIS et al., 2014). A necessidade de estudos mais específicos para introduzir esse elemento na dieta humana, deve-se abordar algumas estratégias para definição de doses, formas de aplicação e fontes de Se, o que poderá proporcionar um consumo adequado desse elemento pelos humanos e animais.

A legislação brasileira não permitia a adição de Se em fertilizantes para fins comerciais. No entanto, recentemente, com o surgimento de pesquisas nacionais sobre o Se na agricultura, essa prática passou a ser liberada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) através da instrução normativa Nº 46 de 22 de Novembro de 2016. Contudo, estudos são necessários a fim de determinar concentrações de Se nos fertilizantes e as possíveis doses dos fertilizantes a serem utilizadas, além dos efeitos de interação que podem ocorrer no sistema solo-planta.

Recentemente, um grande número de trabalhos tem demonstrado a eficácia da biofortificação com Se no acúmulo deste elemento em diferentes culturas alimentares. É notável que grande parte dos estudos sobre a biofortificação com Se envolvam hortaliças, principalmente devido ao fato de muitas delas constituírem a base da alimentação da população de diversos países. Ávila et al. (2013) verificaram em brotos de brócolis que a aplicação de Se na concentração de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ na fonte selenato e selenito de sódio proporcionou teores de Se de 263 e 185 mg kg^{-1} de massa seca, respectivamente. Em brotos de couve-flor, Ávila et al. (2014) obtiveram teor de 230 mg kg^{-1} de massa seca com fornecimento de $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ Se na fonte selenato, quantidades significativas de Se e recomendadas para a dieta humana. Poggi et al. (2000) verificaram que o fornecimento de Se via adubação foliar em batata, tanto na forma de selenato quanto de selenito, aumentou a concentração do elemento nos tubérculos com o fornecimento de Se na dose até 150 g ha^{-1} . Turakainen, Hartikainen e Seppänen (2004) verificaram que o máximo fornecimento de Se ($0,9 \text{ mg kg}^{-1}$ solo) na forma de selenato, promoveu incremento de Se em torno de 20 mg kg^{-1} de massa

seca de tubérculo de batata. Ao avaliar a variação genotípica em acessos de brócolis em resposta às concentrações 0 e 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Se, Ramos et al. (2011c) constataram que todos os acessos acumularam altas concentrações deste elemento, e que a aplicação de Se na concentração adequada não exerce efeito negativo sobre o crescimento das plantas e no teor de enxofre. Ramos et al. (2010) constataram que a aplicação de selenato em baixas concentrações é benéfica para o crescimento da parte aérea, translocação e aumento dos teores de Se na biomassa da alface. Da mesma forma, Ramos et al. (2011a) observaram que a aplicação de selenato na concentração de 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ promoveu acúmulo de Se na parte aérea de acessos de alface, que foi superior aos resultados obtidos quando o selenito foi aplicado. Estes autores relataram, ainda, uma relação sinérgica entre a presença de Se e acúmulo de S em quase todos os acessos tratados com selenato.

1.2.2 Aspectos bioquímicos, fisiológicos e nutricionais do selênio nas plantas

Aparentemente, a nutrição mineral de plantas e a saúde humana são campos bastante distintos, entretanto, quando avaliados na essência, nota-se que estão fortemente conectados. A maior parte dos elementos comprovadamente essenciais ao homem e aos animais também exercem funções importantes no desenvolvimento vegetal e, em muitos casos, seus mecanismos de ação são similares. Nesse sentido, cita-se, por exemplo, a função antioxidante do Se na eliminação de espécies reativas de oxigênio (ERO), que ocorre tanto na planta quanto no organismo humano.

O Se pode controlar a superprodução de ERO, atuando na regulação da atividade antioxidante, mecanismo fundamental para combater o estresse ambiental nas plantas (FENG; WEI; TU, 2013). Em condições normais, a produção de ERO em células de plantas é mantida em níveis baixos. No entanto, em condições de estresse os níveis de ERO são aumentados, afetando os processos metabólicos e, por fim, o crescimento e produção das plantas. A aplicação de Se em baixas concentrações em plantas submetidas a diversos estresses ambientais pode reduzir o excesso de ERO produzido na célula, especialmente das espécies superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e/ou peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (FENG; WEI; TU, 2013).

Vários estudos têm demonstrado que, em baixas concentrações, o Se exerce efeito benéfico sobre o crescimento das plantas e a tolerância a estresses ambientais (PILON-SMITS et al., 2009; DIAO et al., 2014; MALAGOLI et al., 2015). Esses efeitos positivos, provavelmente, estão relacionados com o aumento da capacidade antioxidante, tanto em diminuir a peroxidação de lipídios quanto em aumentar a atividade de enzimas antioxidantes como catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPX) (DJANAGUIRAMAN et al., 2005; FENG; WEI; TU, 2013). No entanto, em elevadas concentrações, o Se tem desencadeado efeitos negativos nas plantas, com redução no crescimento e intensificação dos processos peroxidativos, ocasionando superprodução de ERO (HAWRYLAK-NOWAK, 2013).

Nowak, Kaklewski e Ligocki (2004) encontraram interessantes resultados sobre o efeito do Se na atividade de enzimas antioxidativas. Esses autores observaram que o Se na concentração de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ estimulou positivamente a defesa antioxidante em plantas de trigo, porém, com elevadas concentrações, o Se atuou como pró-oxidante. No entanto, ressalta-se que as culturas agrícolas são sensíveis às altas concentrações de Se no tecido, e essa sensibilidade varia entre as espécies (LYONS; STANGOULIS; GRAHAM, 2005; RANI; DHILLON; DHILLON, 2005). Assim, em função da concentração de Se fornecido, esse exerce duplo efeito no crescimento das plantas. Em baixas concentrações, o Se atua como um antioxidante sendo benéfico para o crescimento das mesmas, enquanto em altas concentrações promove fitotoxicidade (HAWRYLAK-NOWAK, 2013; GUERRERO et al., 2014; HAWRYLAK-NOWAK; MATRASZEK; POGORZELEC, 2015).

Os efeitos positivos de baixas concentrações de Se também contribuem na eficiência do processo fotossintético, devido ao aprimoramento da atividade antioxidante nas células, o que afeta positivamente a fotossíntese, os pigmentos fotossintéticos (DIAO et al., 2014; ZHANG et al., 2014; FENG et al., 2015), a condutância estomática, concentração de CO_2 intercelular e eficiência de transpiração (DJANAGUIRAMAN; PRASAD; SEPPANEN, 2010; ZHANG et al., 2014; JIANG et al., 2015).

Além do selenato (SeO_4^{2-}), que é altamente disponível às raízes, as plantas também absorvem o selenito (SeO_3^{2-}). O processo de absorção desses íons, SeO_4^{2-} e SeO_3^{2-} , difere quanto ao mecanismo de contato com a raiz e ao gasto de energia,

de modo que, o primeiro envolve o fluxo de massa e transporte ativo, e o segundo difusão e transporte passivo, porém, com indícios de transporte ativo (WHITE; BROADLEY, 2009; MALAGOLI et al., 2015; WHITE, 2016). A aquisição de SeO_3^{2-} é inibida pela presença de fosfato (PO_4^{3-}) no meio, mas é reforçada pela deficiência de P nas plantas (HOPPER; PARKER, 1999; LI; MCGRATH; ZHAO, 2008), sugerindo possível envolvimento dos transportadores de PO_4^{3-} na aquisição e absorção do SeO_3^{2-} pelas plantas. Os transportadores de sulfato (SO_4^{2-}) de alta afinidade são gerenciados pelo conteúdo de S da planta e estão envolvidos na absorção do SeO_4^{2-} do solo para a raiz (TERRY et al., 2000; WHITE et al., 2004; PILON-SMITS et al., 2009).

A translocação e o transporte do Se é dependente da forma que o mesmo é fornecido para planta, pois o SeO_4^{2-} é preferencialmente absorvido e mais facilmente transportado via xilema, ao contrário do SeO_3^{2-} ou Se orgânico, como a selenometionina (SeMet) (WHITE et al., 2004; WHITE, 2016). A razão pela qual o SeO_3^{2-} é translocado em menores quantidades para parte aérea pode ser explicada pelo fato de que o mesmo é rapidamente convertido em formas orgânicas de Se nas raízes, como a SeMet (LI; MCGRATH; ZHAO, 2008; KAUR; SHARMA; NAYYAR, 2014).

As características bioquímicas entre Se e S são similares, de modo que o Se segue a mesma via de assimilação do S nas plantas (PILON-SMITS et al., 2009). Após a sua absorção pelas raízes, o Se na forma de selenato permanece nessa forma até que a ATP sulfurilase (APS) entre em ação transformando-o em adenosina fosforoselenato (APSe). Em seguida a APSe é convertida em selenito pela ação da enzima adenosina fósforo selenatoredutase (APR). Na sequência, o SeO_3^{2-} é transformado em Se^{2-} pela intervenção da enzima sulfito redutase e, finalmente, o Se^{2-} é convertido em selenocisteína (SeCys) pela ação da O-acetilserina (tiol)liase (OAS). Por ser muito instável, a SeCys é imediatamente convertida em outros compostos, como metilselenocisteína (MeSeCys). Todas as etapas citadas anteriormente ocorrem nos plastídios celulares. No citosol, ocorre a formação da selenometionina (SeMet), que é transformada a partir da selenohomocisteína (SehoCys) pela ação da metionina sintase. Ainda no citosol a SeMet pode se transformar em compostos voláteis de Se,

proteínas ou, entrar nos plastídios e se ligar a proteínas (TERRY et al., 2000; WHITE et al., 2004; WHITE, 2016).

As plantas possuem capacidades diferentes em acumular e tolerar Se, podendo ser classificadas como não-acumuladoras, acumuladoras e hiperacumuladoras (TERRY et al., 2000; WHITE et al., 2004). As plantas hiperacumuladoras de Se são nativas de solos seleníferos e acumulam Se em níveis 100 vezes maiores do que as plantas não-acumuladoras, sendo capazes de acumular teores superiores a 2.000 mg kg⁻¹, como é o caso das plantas dos gêneros *Astragalus*, *Stanleya*, *Morinda*, *Neptunia*, *Oenopsis*, *Xylorhiza* e *Cardamine* (WHITE, 2016). As plantas acumuladoras crescem em solos com teores de Se variando de baixo a médio e podem acumular até 1.000 mg kg⁻¹ de selênio na matéria seca. Exemplos de plantas desse grupo são a mostarda indiana (*Brassica juncea*) e canola (*B. napus*). A maior parte das culturas agrícolas apresentam baixa tolerância a altas concentrações de Se, apresentando, geralmente, menos de 25 mg kg⁻¹ de Se na massa seca e são classificadas como não acumuladoras (TERRY et al., 2000).

1.3 REFERÊNCIAS

ARTHUR, J. R. Selenium supplementation: does soil supplementation help and why? **Proceedings of the Nutrition Society**, London, v. 62, n. 2, p. 393–397, 2003.

ÁVILA, F. W.; FAQUIN, V.; YANG, Y.; RAMOS, S. J.; GUILHERME, L. R. G.; THANNHAUSER, T. W.; LI, L. Assessment of the Anticancer Compounds Se - Methylselenocysteine and Glucosinolates in Se-Biofortified Broccoli (*Brassica oleracea* L. var. italica) Sprouts and Florets. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 61, n. 26, p. 6216–6223, 2013.

ÁVILA, F. W.; YANG, Y.; FAQUIN, V.; RAMOS, S. J.; GUILHERME, L. R. G.; THANNHAUSER, T. W.; LI, L. Impact of selenium supply on Se-methylselenocysteine and glucosinolate accumulation in selenium-biofortified Brassica sprouts. **Food Chemistry**, London, v. 165, p. 578–586, 2014.

BAÑUELOS, G. S.; ARROYO, I. S.; DANGI, S. R.; ZAMBRANO, M. C. Continued Selenium Biofortification of Carrots and Broccoli Grown in Soils Once Amended with Se-enriched *S. pinnata*. **Frontiers in Plant Science**, London, v. 7, n. August, p. 1–11, 2016.

BROADLEY, M. R.; WHITE, P. J.; BRYSON, R. J.; MEACHAM, M. C.; BOWEN, H. C.; JOHNSON, S. E.; HAWKESFORD, M. J.; MCGRATH, S. P.; ZHAO, F.-J.; BREWARD, N.; HARRIMAN, M.; TUCKER, M. Biofortification of UK food crops with selenium. **Proceedings of the Nutrition Society**, London, v. 65, n. 2, p. 169–181, 2006.

CARY, E. E.; ALLAWAY, W. H. Selenium Content of Field Crops Grown on Selenite-Treated Soils¹. **Agronomy Journal**, Madison, v. 65, n. 6, p. 922, 1973.

CASTILLO-GODINA, R. G.; FOROUGHBAKHCH-POURNAVAB, R.; BENAVIDES-MENDOZA, A. Effect of selenium on elemental concentration and antioxidant enzymatic activity of tomato plants. **Journal of Agricultural Science and Technology**, Tehran, v. 18, n. 1, p. 233–244, 2016.

DIAO, M.; MA, L.; WANG, J.; CUI, J.; FU, A.; LIU, H. Selenium Promotes the Growth and Photosynthesis of Tomato Seedlings Under Salt Stress by Enhancing Chloroplast Antioxidant Defense System. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 33, n. 3, p. 671–682, 2014.

DJANAGUIRAMAN, M.; DEVI, D. D.; SHANKER, A. K.; SHEEBA, J. A.; BANGARUSAMY, U. Selenium – an antioxidative protectant in soybean during senescence. **Plant and Soil**, The Hague, v. 272, n. 1–2, p. 77–86, 2005.

DJANAGUIRAMAN, M.; PRASAD, P. V. V.; SEPPANEN, M. Selenium protects sorghum leaves from oxidative damage under high temperature stress by enhancing antioxidant defense system. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 48, n. 12, p. 999–1007, 2010.

FAIRWEATHER-TAIT, S. J.; BAO, Y.; BROADLEY, M. R.; COLLINGS, R.; FORD, D.; HESKETH, J. E.; HURST, R. Selenium in Human Health and Disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, New Rochelle, v. 14, n. 7, p. 1337–1383, 2011.

FAIRWEATHER-TAIT, S. J.; COLLINGS, R.; HURST, R. Selenium bioavailability: current knowledge and future research requirements. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 91, n. 5, p. 1484S–1491S, 2010.

FENG, R.; WEI, C.; TU, S. The roles of selenium in protecting plants against abiotic stresses. **Environmental and Experimental Botany**, Elmosford, v. 87, p. 58–68, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.09.002>>.

FENG, T.; CHEN, S. S.; GAO, D. Q.; LIU, G. Q.; BAI, H. X.; LI, A.; PENG, L. X.; REN, Z. Y. Selenium improves photosynthesis and protects photosystem II in pear (*Pyrus bretschneideri*), grape (*Vitis vinifera*), and peach (*Prunus persica*). **Photosynthetica**, Prague, v. 53, n. 4, p. 609–612, 2015.

FERREIRA, K. S.; GOMES, J. C.; BELLATO, C. R.; JORDÃO, C. P. Concentrações de selênio em alimentos consumidos no Brasil. **Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health**, Washington, v. 11, n. 3, p. 172–177, 2002.

GABOS, M. B.; ALLEONI, L. R. F.; ABREU, C. A. Background levels of selenium in some selected Brazilian tropical soils. **Journal of Geochemical Exploration**, Amsterdam, v. 145, p. 35-39, 2014.

GUERRERO, B.; LLUGANY, M.; PALACIOS, O.; VALIENTE, M. Dual effects of different selenium species on wheat. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 83, p. 300–307, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.08.009>>.

HARTIKAINEN, H. Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, New York, v. 18, n. 4, p. 309–318, 2005.

HAWRYLAK-NOWAK, B. Comparative effects of selenite and selenate on growth and selenium accumulation in lettuce plants under hydroponic conditions. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 70, n. 2, p. 149–157, 2013.

HAWRYLAK-NOWAK, B.; MATRASZEK, R.; POGORZELEC, M. The dual effects of two inorganic selenium forms on the growth, selected physiological parameters and macronutrients accumulation in cucumber plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 37, n. 2, p. 1–13, 2015.

HOPPER, J. L.; PARKER, D. R. Plant availability of selenite and selenate as influenced by the competing ions phosphate and sulfate. **Plant and Soil**, The Hague, v. 210, n. 2, p. 199–207, 1999.

JEŽEK, P.; ŠKARPA, P.; LOŠÁK, J.; HLUŠEK, J.; JÚZL, M.; ELZNER, P. Selenium - in important antioxidant in crops biofortification. In: _____. (Ed.). **Antioxidant Enzyme**. InTech: Croatia, 2012, cap. 13, p. 343-368.

JIANG, C.; ZU, C.; SHEN, J.; SHAO, F.; LI, T. Effects of selenium on the growth and photosynthetic characteristics of flue-cured tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, Warszawa, v. 84, n. 1, p. 71–77, 2015.

KAUR, N.; SHARMA, S.; NAYYAR, H. Selenium in Agriculture: A Nutrient or Toxin for Crops? **Archives of Agronomy and Soil Science**, London, v. 60, n. 12, p. 1593-1624, 2014.

LI, H. F.; MCGRATH, S. P.; ZHAO, F. J. Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite. **New Phytologist**, Cambridge, v. 178, n. 1, p. 92–102, 2008.

LYONS, G.; STANGOULIS, J.; GRAHAM, R. High-selenium wheat: biofortification for better health. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 16, n. 1, p. 45-60, 2003.

LYONS, G. H.; STANGOULIS, J. C. R.; GRAHAM, R. D. Tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.) to high soil and solution selenium levels. **Plant and Soil**, The Hague, v. 270, n. 1, p. 179–188, 2005.

MALAGOLI, M.; SCHIAVON, M.; DALL'ACQUA, S.; PILON-SMITS, E. a H. Effects of selenium biofortification on crop nutritional quality. **Frontiers in plant science**, London, v. 6, n. April, p. 280, 2015.

MALAVOLTA, E. **Selênio em fertilizantes**. Piracicaba: CENA-USP, 1996. 16p. Relatório.

MORA, M. .; DURÁN, P.; ACUÑA, J.; CARTES, P.; DEMANET, R.; GIANFREDA, L. Improving selenium status in plant nutrition and quality. **Journal of soil science and plant nutrition**, Temuco, v. 15, n. 2, p. 486–503, 2015.

NOWAK, J.; KAKLEWSKI, K.; LIGOCKI, M. Influence of selenium on oxidoreductive enzymes activity in soil and in plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 36, n. 10, p. 1553–1558, 2004.

PILON-SMITS, E. A.; QUINN, C. F.; TAPKEN, W.; MALAGOLI, M.; SCHIAVON, M. Physiological functions of beneficial elements. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, n. 3, p. 267–274, 2009.

POGGI, V.; ARCIONI, A.; FILIPPINI, P.; PIFFERI, P. G. Foliar application of selenite and selenate to potato (*Solanum tuberosum*): effect of a ligand agent on selenium content of tubers. **Journal of agricultural and food chemistry**, Easton, v. 48, n. 10, p. 4749–51, 2000.

PUCCINELLI, M.; MALORGIO, F.; PEZZAROSSA, B. Selenium Enrichment of Horticultural Crops. **Molecules**, Basel, v. 22, n. 6, p. 933, 2017.

RAMOS, S. J.; FAQUIN, V.; DE ALMEIDA, H. J.; AVILA, F. W.; GUIMARAES GUILHERME, L. R.; ALVES BASTOS, C. E.; AVILA, P. A. Selenate and Selenite on Yield, Mineral Nutrition and Biofortification With Selenium in Lettuce Cultivars. **Revista Brasileira De Ciência Do Solo**, Viçosa, v. 35, n. 4, p. 1347–1355, 2011a.

RAMOS, S. J.; FAQUIN, V.; GUILHERME, L. R. G.; CASTRO, E. M.; ÁVILA, F. W.; CARVALHO, G. S.; BASTOS, C. E. A.; OLIVEIRA, C. Selenium biofortification and antioxidant activity in lettuce plants fed with selenate and selenite. **Plant, Soil and Environment**, Prague, v. 56, n. 12, p. 584–588, 2010.

RAMOS, S. J.; RUTZKE, M. A.; HAYES, R. J.; FAQUIN, V.; GUILHERME, L. R. G.; LI, L. Selenium accumulation in lettuce germplasm. **Planta**, Berlin, v. 233, n. 4, p. 649–660, 2011b.

RAMOS, S. J.; YUAN, Y.; FAQUIN, V.; GUILHERME, L. R. G.; LI, L. Evaluation of Genotypic Variation of Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) in Response to Selenium Treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, n. 8, p. 3657–3665, 2011c.

RANI, N.; DHILLON, K. S.; DHILLON, S. K. Critical Levels of Selenium in Different Crops Grown in an Alkaline Silty Loam Soil Treated with Selenite-Se. **Plant and Soil**, The Hague, v. 277, n. 1–2, p. 367–374, 2005.

REIS, A. R.; FURLANI JUNIOR, E.; MORAES, M. F.; DE MELO, S. P. Biofortificação agrônômica com selênio no Brasil como estratégia para aumentar a qualidade dos produtos agrícolas. **Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas**, Tupã, v. 8, n. 2, p. 128, 2014.

RIOS, J. J.; BLASCO, B.; LEYVA, R.; SANCHEZ-RODRIGUEZ, E.; RUBIO-WILHELMI, M. M.; ROMERO, L.; RUIZ, J. M. Nutritional Balance Changes in Lettuce Plant Grown Under Different Doses and Forms of Selenium. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 36, n. 9, p. 1344–1354, 2013.

SORS, T. G.; ELLIS, D. R.; SALT, D. E. Selenium uptake, translocation, assimilation and metabolic fate in plants. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 86, n. 3, p. 373–389, 2005.

TERRY, N.; ZAYED, A. M.; DE SOUZA, M. P.; TARUN, A. S. SELENIUM IN HIGHER PLANTS. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 51, n. 1, p. 401–432, 2000.

TURAKAINEN, M.; HARTIKAINEN, H.; SEPPÄNEN, M. M. Effects of Selenium Treatments on Potato (*Solanum tuberosum* L.) Growth and Concentrations of Soluble Sugars and Starch. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 17, p. 5378–5382, 2004.

WHITE, P. J. Selenium accumulation by plants. **Annals of Botany**, London, v. 117, n. 2, p. 217–235, 2016.

WHITE, P. J.; BOWEN, H. C.; PARMAGURU, P.; FRITZ, M.; SPRACKLEN, W. P.; SPIBY, R. E.; MEACHAM, M. C.; MEAD, A.; HARRIMAN, M.; TRUEMAN, L. J.; SMITH, B. M.; THOMAS, B.; BROADLEY, M. R. Interactions between selenium and sulphur nutrition in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 404, p. 1927–1937, 2004.

WHITE, P. J.; BROADLEY, M. R. Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets – iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. **New Phytologist**, Cambridge, v. 182, p. 49–84, 2009.

WINKEL, L.; VRIENS, B.; JONES, G.; SCHNEIDER, L.; PILON-SMITS, E.; BAÑUELOS, G. Selenium Cycling Across Soil-Plant-Atmosphere Interfaces: A Critical Review. **Nutrients**, Basel, v. 7, n. 6, p. 4199–4239, 2015.

ZHANG, M.; TANG, S.; HUANG, X.; ZHANG, F.; PANG, Y.; HUANG, Q.; YI, Q. Selenium uptake, dynamic changes in selenium content and its influence on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in rice (*Oryza sativa* L.). **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 107, p. 39–45, 2014.

CAPÍTULO 2 – Biofortificação da couve-flor com selênio e seu efeito no crescimento e acúmulo de nutrientes

RESUMO - A biofortificação é uma estratégia eficaz para aumentar a concentração de Se em partes comestíveis de plantas. Entretanto, o sucesso da técnica depende do fornecimento de Se na fonte e concentração adequada, de forma que não prejudique o crescimento e a produção da planta. Para avaliar o efeito do Se na nutrição, no crescimento e biofortificação das plantas, realizou-se um experimento com couve-flor em cultivo hidropônico, aplicando fontes (selenato e selenito de sódio) e concentrações de Se (0, 5, 15, 30 e 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Altas concentrações de Se, principalmente na fonte selenito, afetou negativamente o crescimento e o teor dos nutrientes na inflorescência, depreciando a qualidade do produto. A aplicação de Se na concentração de 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, na fonte selenato, não prejudicou a produção e o estado nutricional da planta, mas proporcionou teor de Se na inflorescência da couve-flor superior ao limite estabelecido pelo *Codex Alimentarius*.

Palavras-chave: *Brassica oleracea var. botrytis*, selenato, selenito, macronutrientes

2.1 INTRODUÇÃO

O selênio (Se) é um elemento essencial para o metabolismo dos seres humanos e animais (HAWRYLAK-NOWAK; MATRASZEK; POGORZELEC, 2015; WHITE, 2016), e devido seu papel antioxidante, torna-se fundamental na prevenção de doenças e desordens no organismo. A ingestão recomendada de Se para o bem-estar humano compreende uma dieta de 55 µg Se por dia (WHITE, 2016). Entretanto, estima-se que 15% da população mundial seja deficiente em Se (HAWRYLAK-NOWAK, 2013), fato decorrente principalmente do consumo de alimentos com baixo teor de Se e a produção de culturas em solos pobres desse elemento (HAWRYLAK-NOWAK, 2013; GUERRERO et al., 2014).

Uma das estratégias para mitigar a deficiência e aumentar a ingestão de Se pela população tem sido a técnica de biofortificação, que procura aumentar a concentração de Se em partes comestíveis de plantas (WHITE; BROADLEY, 2009; BAÑUELOS et al., 2016). Entretanto, para o sucesso desse método é fundamental que o crescimento e potencial produtivo da cultura não sejam afetados.

Estudos recentes têm confirmado o efeito biofortificante de Se em culturas hortícolas, principalmente Brássicas, como repolho (MECHORA et al., 2011), brócolis (SINDELÁROVÁ et al., 2015) e couve (LEFSRUD et al., 2006), com ação benéfica para o crescimento e produção das plantas. O selenato e selenito são as principais formas de fornecimento de Se às plantas e dependendo da quantidade aplicada podem causar fitotoxicidade em razão dessas formas serem metabolizadas pela mesma via de seus análogos de enxofre (S), tendo incorporação de Se em todos os metabólitos sulfurados (WHITE et al., 2004; WHITE, 2016).

Possíveis interações e competições entre Se e outros nutrientes são, atualmente, questões pouco esclarecidas e cujos resultados têm se indicado contraditórios (KOPSELL; RANDLE; MILLS, 2000; LEFSRUD et al., 2006; FENG et al., 2009; HAWRYLAK-NOWAK, 2013; DRAHOŇOVSKÝ et al., 2016; LONGCHAMP; ANGELI; CASTREC-ROUELLE, 2016), com melhor compreensão entre Se, P e S (HOPPER; PARKER, 1999; WHITE et al., 2004; LI; MCGRATH; ZHAO, 2008). Pesquisas evidenciaram interferência do Se no acúmulo de macronutrientes e micronutrientes, com possíveis implicações nos processos metabólicos da planta. A

ação do Se na absorção e translocação de alguns nutrientes, principalmente catiônicos, pode afetar indiretamente a atividade antioxidante de enzimas, a produção de espécies reativas de oxigênio e tolerância da planta aos estresses ambientais (FENG; WEI; TU, 2013). Variações nas concentrações de Fe, Zn, Mn e Cu nos tecidos foliares de milho foram observados por Longchamp, Angeli e Castrec-Rouelle (2016), ao fornecerem Se as plantas, refletindo na regulação das espécies de oxigênio pela atividade das enzimas, que utilizam esses nutrientes como co-fatores.

Dessa forma, conhecer como o fornecimento de Se interage com a absorção de macronutrientes e micronutrientes e com o crescimento da planta é fundamental para um programa de biofortificação (GUERRERO et al., 2014). Ressalta-se que mesmo ocorrendo aumento de Se na parte comestível das plantas, a biofortificação apenas será viável se o teor de Se no tecido vegetal não ultrapassar o limite máximo de 0,3 mg kg⁻¹ admitido pelo *Codex Alimentarius*, órgão das Nações Unidas, Organização para Alimentos e Agricultura e Organização Mundial da Saúde (ONU/FAO/OMS), que visa promover a segurança e qualidade na alimentação da população. Ainda, para efeito de biofortificação, o fornecimento de Se também não deve causar desequilíbrio nos demais nutrientes absorvidos pela planta e não reduzir a produtividade (LONGCHAMP; ANGELI; CASTREC-ROUELLE, 2016).

A couve-flor, por ser uma brássica amplamente consumida no Brasil e no mundo, é uma hortaliça recomendável a integrar programas de biofortificação de Se, sobretudo, em vista dos baixos teores de Se encontrados nesta hortaliça comercializada no Brasil, que varia entre 0,002 a 0,013 mg kg⁻¹ Se na massa fresca (FERREIRA et al., 2002).

Assim, diante do exposto e considerada a importância de se estudar a resposta de culturas ao fornecimento de Se, associada à escassez de informações sobre os efeitos da biofortificação desse elemento na absorção e acúmulo de outros nutrientes, realizou-se este estudo com o objetivo de avaliar o efeito de fontes e concentrações de Se na nutrição, no crescimento e biofortificação de couve-flor.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Localização e caracterização da área experimental

O experimento foi realizado em ambiente protegido, em cultivo hidropônico, entre 23 de janeiro a 30 de abril de 2015, na Universidade Estadual Paulista, campus de Jaboticabal, São Paulo (21° 15' 22" S, 48° 15' 58" W e 615 m de altitude). Durante o experimento foi registrado temperaturas máxima média de 31 °C, mínima média de 19,7 °C e umidade relativa média do ar de 77%.

2.2.2 Instalação e condução do experimento

Utilizou-se o híbrido de couve-flor 'Sharon' que foi semeado em espuma fenólica (Green Up[®]) contendo 216 células de 2,5; 2,5 e 3,8 cm de largura, comprimento e altura, respectivamente. Aos 10 dias após a semeadura (DAS), as plântulas com os cotilédones totalmente desenvolvidos foram transferidas para sistema hidropônico NFT (*nutrient film technique*), permanecendo neles até apresentarem quatro folhas totalmente desenvolvidas. Em seguida, procedeu-se o transplante para canais hidropônicos de policloreto de polivinila (PVC), com 0,20 de diâmetro e 2,0 m de comprimento, cobertos com papel Tetra Pak[®] para evitar a incidência de luz na solução nutritiva. O espaçamento utilizado foi de 0,50 m entre plantas e 1,0 m entre canais de cultivo, os quais foram instalados com 5% de declividade e ligados a um reservatório com capacidade para 40 L de solução nutritiva, sendo essa bombeada para os canais por meio de bombas submersas.

Utilizou-se a solução nutritiva de Hoagland e Arnon (HOAGLAND; ARNON, 1950), com modificações nas concentrações de N (189 mg L⁻¹), K (211 mg L⁻¹) e Ca (150 mg L⁻¹), preparada com água deionizada. O pH foi monitorado e mantido durante todo o período experimental entre 5,8 e 6,5. A solução foi renovada sempre que a condutividade elétrica atingiu 1,5 dS m⁻¹, correspondente a 70% da inicial.

2.2.3 Tratamentos e delineamento experimental

Os tratamentos utilizados foram fontes químicas de selênio (selenato de sódio – Na_2SeO_4 e selenito de sódio – $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich) e concentrações de Se (0, 5, 15, 30 e 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 2 x 5, com quatro repetições e unidade experimental constituída de quatro plantas por canal.

O fornecimento de Se foi realizado a partir dos 15 dias após a transferência das plantas para os canais de PVC até o final do ciclo de cultivo. A aplicação de Se foi realizada diretamente na solução nutritiva e sempre na ocasião de sua renovação, o que correspondeu a 9 aplicações durante o ciclo de cultivo.

2.2.4 Características avaliadas

Produção e massa seca da couve-flor

Determinou-se a massa fresca da inflorescência (MFI - g) e massa seca da raiz (MSR - g), caule (MSC - g), folhas (MSF - g) e inflorescência (MSI - g) da couve-flor. Aos 100 DAS, as plantas foram colhidas e a inflorescência pesada em balança analítica para determinação da massa fresca. Em seguida, as partes da planta foram separadas e secas em estufa (65 °C) por 72 horas para posterior determinação da massa seca.

Teor e acúmulo de nutrientes

Os teores de macronutrientes e micronutrientes foram determinados em folhas recém-desenvolvidas (folha diagnóstica) coletadas no início da formação da inflorescência (TRANI; RAIJ, 1997) e no momento da colheita da inflorescência. Os materiais vegetais coletados foram separados, lavados em água corrente, mergulhados em solução de ácido clorídrico (1%) e depois em água deionizada. Posteriormente, as amostras foram secas em estufa de circulação forçada de ar (65 °C) até obter massa constante, e logo depois foram moídas em moinho de facas. Em

seguida, obteve-se o extrato para determinar os teores dos nutrientes utilizando-se métodos propostos por Miyazawa et al. (2009). De posse da massa seca e teor dos nutrientes foram calculados os acúmulos de macronutrientes e os micronutrientes Cu, Fe, Mn e Zn na inflorescência.

Teor de Se

O teor de Se foi determinado nas folhas coletadas para avaliação do estado nutricional (início do florescimento) e na raiz, caule, folha e inflorescência no momento da colheita. A análise foi realizada pela técnica de espectrometria de fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDXRF - energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry) descrita por Tezotto et al. (2013).

Eficiências de absorção, translocação e utilização de Se

Obtido os dados de teor de Se e massa seca, foram calculados os índices de eficiência de absorção de Se – EA_{Se} (HAMMOND et al., 2009), eficiência de translocação de Se – ET_{Se} (LI; MCKEAND; ALLEN, 1991) e eficiência de utilização de Se – EU_{Se} (HAMMOND et al., 2009), utilizando as seguintes equações:

$$EA_{Se} = \frac{(TSe_T \times MSI_T) - (TSe_C \times MSI_C)}{\Delta QSe} \quad (1)$$

em que: EA_{Se} = eficiência de absorção de Se ($mg\ g^{-1}$ Se aplicado); TSe_T = teor de Se na inflorescência da couve-flor no tratamento com aplicação de Se ($mg\ kg^{-1}$); MSI_T = massa seca da inflorescência da couve-flor no tratamento com aplicação de Se ($g\ planta^{-1}$); TSe_C = teor de Se na inflorescência da couve-flor no controle ($mg\ kg^{-1}$); MSI_C = massa seca da inflorescência da couve-flor no controle ($g\ planta^{-1}$); e ΔQSe = diferença na quantidade de Se aplicado entre o tratamento com Se e o controle.

$$ET_{Se} = \frac{A_{SePA}}{A_{Se}} \times 100 \quad (2)$$

sendo: ET_{Se} = eficiência de translocação de Se (%); $ASePA$ = acúmulo de Se na parte aérea da planta de couve-flor ($mg\ planta^{-1}$); e ASe = acúmulo total de Se na planta de couve-flor ($mg\ planta^{-1}$).

$$EU_{Se} = \frac{(MSI_T - MSI_C)}{(TSe_T \times MSI_T) - (TSe_C \times MSI_C)} \quad (3)$$

onde: EU_{Se} = eficiência de utilização de Se na inflorescência ($g\ mg^{-1}\ Se$); MSI_T = massa seca da inflorescência da couve-flor no tratamento com aplicação de Se ($g\ planta^{-1}$); MSI_C = massa seca da inflorescência da couve-flor no controle ($g\ planta^{-1}$); TSe_T = teor de Se na inflorescência da couve-flor no tratamento com aplicação de Se ($mg\ kg^{-1}$); TSe_C = teor de Se na inflorescência da couve-flor no controle ($mg\ kg^{-1}$).

2.2.5 Análise estatística

Os dados das variáveis foram submetidos à análise de variância pelo teste F ($\alpha \leq 5\%$). As fontes de Se foram comparadas pelo teste de F e para as concentrações realizaram-se estudos de regressão, optando-se pela equação significativa e com maior coeficiente de determinação. Em todas as análises utilizou-se o programa estatístico *AgroEstat* (BARBOSA; MALDONATO JÚNIOR, 2015).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Teor e acúmulo de Se

As fontes e concentrações de Se influenciaram significativamente o teor de Se na folha diagnóstica (FD) e o teor de Se na raiz, no caule, na folha e na inflorescência da couve-flor (Tabela 1). A interação entre os fatores também apresentou efeito significativo para estas variáveis.

Tabela 1. Resumo da análise de variância para teor de Se na folha diagnóstica (FD), na raiz, folha, caule e inflorescência da couve-flor no final do ciclo em função de fontes e concentrações de Se.

Causa da Variação	Teor de Se				
	FD	Raiz	Caule	Folha	Inflorescência
Fontes Se (F)	689,8** ¹	1159,3**	665,8**	1299,3**	1269,3**
Concentração Se (C)	289,1**	327,2**	507,4**	489,9**	1334,9**
F x C	190,8**	184,8**	228,3**	346,1**	554,7**
CV (%)	19,6	14,7	14,3	14,4	8,9
Fontes de Se	Média dos Teores (mg kg ⁻¹)				
Selenato	268,2 a	63,7 b	142,4 a	283,8 a	330,3 a
Selenito	27,5 b	551,2 a	37,3 b	27,4 b	108,7 b
DMS	18,7	29,2	8,3	14,5	12,7
Concentrações de Se	Média dos Teores (mg kg ⁻¹)				
0 µmol L ⁻¹	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5 µmol L ⁻¹	21,4	108,5	14,1	26,0	37,7
15 µmol L ⁻¹	90,2	259,7	62,2	98,7	138,5
30 µmol L ⁻¹	201,6	434,1	120,1	223,8	296,6
60 µmol L ⁻¹	426,1	735,1	252,9	429,6	624,7

¹ Teste F, **: p ≤ 0,01. CV: coeficiente de variação; DMS: diferença mínima significativa

O aumento da concentração de Se na solução nutritiva, seja na fonte selenato ou selenito, incrementou linearmente o teor deste elemento na folha diagnóstica (Figura 1). Maiores teores de Se foram obtidos com selenato, alcançando teor máximo de 775 mg kg⁻¹ de massa seca com aplicação de 60 µmol L⁻¹ Se. Contudo, com selenito e em folhas de plantas submetidas à mesma concentração de Se, o teor máximo de Se (77 mg kg⁻¹) foi dez vezes menor que o observado com selenato.

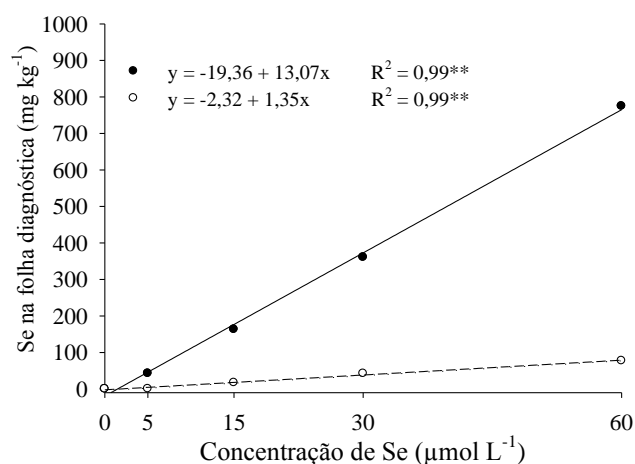


Figura 1. Teor de Se na folha diagnóstica de couve-flor em função de fontes (● selenato; ○ selenito) e concentrações de Se.

A aplicação de selenato promoveu maiores teores de Se na inflorescência e, em seguida, na folha, no caule e na raiz, com teores máximos de 1.017, 792, 421 e 179 mg kg⁻¹, respectivamente, na concentração de 60 μmol L⁻¹ Se (Figura 2A). Assim como observado para selenato, o aumento da concentração de Se na solução nutritiva, via selenito, incrementou os teores de Se nas partes da couve-flor. Entretanto, com selenito, os maiores teores de Se foram observados na raiz, com máximo de 1.291 mg kg⁻¹ (Figura 2B). Nesta fonte, independente da concentração utilizada, os teores de Se na inflorescência foram cerca de cinco vezes inferiores aos encontrados na raiz, sendo observado máximo teor de 232 mg kg⁻¹. Na folha e caule foram encontrados teores semelhantes, com máximos de 67 e 85 mg kg⁻¹, respectivamente.

O acúmulo de Se nas partes da planta de couve-flor foram influenciadas pelo fornecimento de Se nas fontes e concentrações (Tabela 2). A interação desses fatores também afetou significativamente o acúmulo de Se na planta de couve-flor.

Tabela 2. Resumo da análise de variância para acúmulo de Se na raiz, folha, caule e inflorescência da couve-flor no final do ciclo em função de fontes e concentrações de Se.

Causa da Variação	Acúmulo de Se			
	Raiz	Caule	Folha	Inflorescência
Fontes Se (F)	440,1 ^{**1}	234,3 ^{**}	1551,2 ^{**}	91,5 ^{**}
Concentração Se (C)	119,5 ^{**}	149,8 ^{**}	490,1 ^{**}	84,4 ^{**}
F x C	65,6 ^{**}	72,0 ^{**}	380,2 ^{**}	30,8 ^{**}
CV (%)	23,6	25,3	13,8	31,6

Fontes de Se	Média dos acúmulos (mg planta ⁻¹)			
Selenato	1,1 b	3,85 a	63,2 a	18,6 a
Selenito	9,3 a	0,92 b	4,7 b	6,6 b
DMS	0,79	0,39	3,0	2,6

Concentrações de Se	Média dos acúmulos (mg planta ⁻¹)			
0 µmol L ⁻¹	0,0	0,0	0,0	0,0
5 µmol L ⁻¹	1,7	0,4	5,6	2,3
15 µmol L ⁻¹	4,5	1,7	24,2	9,5
30 µmol L ⁻¹	8,1	3,4	50,7	20,5
60 µmol L ⁻¹	11,7	6,4	89,3	30,9

¹ Teste F, **: p ≤ 0,01. CV: coeficiente de variação; DMS: diferença mínima significativa

Os acúmulos de Se nas plantas de couve-flor obtidos com selenato foram maiores que com selenito (Figura 2C e D). Com selenato, independente da concentração de Se, a folha foi a parte da planta com maior acúmulo de Se, 168 mg, seguida pela inflorescência (50 mg planta⁻¹). As quantidades de Se no caule (11 mg) e raiz (3 mg) foram pequenas quando tratadas com selenato (Figura 2C). Por outro lado, plantas tratadas com selenito acumularam elevadas quantidades de Se na raiz, sendo a concentração de Se de 60 µmol L⁻¹ a que resultou em maior acúmulo (20 mg planta⁻¹) (Figura 2D). Na inflorescência e folhas da couve-flor, os acúmulos foram semelhantes, com resultados máximos de 13 e 10 mg de Se com 40 e 55 µmol L⁻¹, respectivamente. No caule, o acúmulo máximo foi de 2 mg quando tratou-se as plantas com 60 µmol L⁻¹ de Se na solução nutritiva.

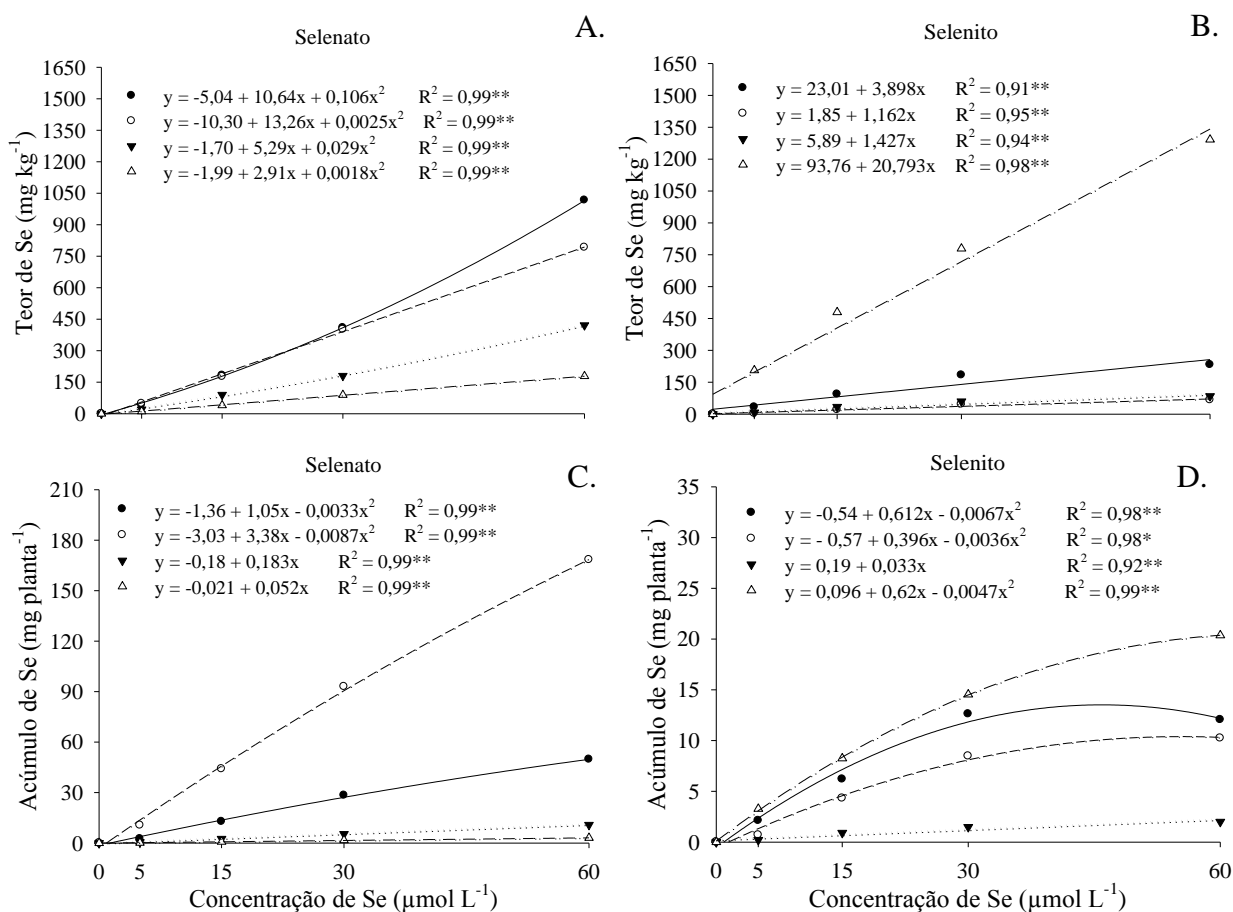


Figura 2. Efeito das concentrações de Se no teor (A) e acúmulo de Se (C) na fonte selenato, e teor (B) e acúmulo de Se (D) na fonte selenito, em raiz (Δ), caule (∇), folha (\circ) e inflorescência (\bullet) de couve-flor em solução nutritiva.

2.3.2 Teor de nutrientes na folha diagnóstica

Os teores foliares de P, S, Ca e Mg foram afetados pelas fontes e concentrações de Se. N e K não sofreram alterações em seus teores em função dos fatores avaliados, porém, os teores médios foram 38 e 27 g kg^{-1} , respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Resumo da análise de variância para teor de macronutrientes na folha diagnóstica da couve-flor em função de fontes e concentrações de Se.

Causa da Variação	Teor macronutrientes					
	N	P	S	K	Ca	Mg
Fontes Se (F)	3,24 ^{ns1}	82,33 ^{**}	115,3 ^{**}	0,53 ^{ns}	8,89 ^{**}	14,05 ^{**}
Concentração Se (C)	1,38 ^{ns}	42,31 ^{**}	2,29 ^{ns}	0,51 ^{ns}	12,8 ^{**}	5,63 ^{**}
F x C	0,73 ^{ns}	25,33 ^{**}	7,54 ^{**}	0,12 ^{ns}	1,02 ^{ns}	0,91 ^{ns}
CV (%)	6,1	9,1	15,6	13,9	13,1	16,9
Fontes de Se	Média dos Teores (g kg ⁻¹)					
Selenato	38,44 a	2,59 a	15,81 a	27,53 a	12,80 a	5,56 a
Selenito	37,12 a	1,99 b	9,17 b	26,67 a	11,31 b	4,54 b
DMS	1,49	0,13	1,26	2,43	1,02	0,55
Concentrações de Se	Média dos Teores (g kg ⁻¹)					
0 µmol L ⁻¹	37,35	3,04	13,96	27,33	15,00	5,95
5 µmol L ⁻¹	38,93	2,24	13,01	28,30	13,15	5,34
15 µmol L ⁻¹	38,26	2,32	11,90	27,53	10,80	5,03
30 µmol L ⁻¹	38,12	2,09	12,35	26,50	11,20	4,96
60 µmol L ⁻¹	36,43	1,74	11,24	25,84	10,13	3,97

¹ Teste F, **: p ≤ 0,01; ns: não significativo; CV: coeficiente de variação; DMS: diferença mínima significativa

Sob baixas concentrações de Se ($\leq 5 \mu\text{mol L}^{-1}$), os teores de P, Ca, Mg e S foram semelhantes aos encontrados no controle ($0 \mu\text{mol L}^{-1}$). A aplicação crescente de Se, em ambas as fontes, reduziram o teor de P na folha diagnóstica. Entretanto, com selenato, os teores de P foram de 3,1 a 1,6 g kg⁻¹ nas concentrações de 0 a 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, sendo superiores aos observados com selenito (Figura 3A).

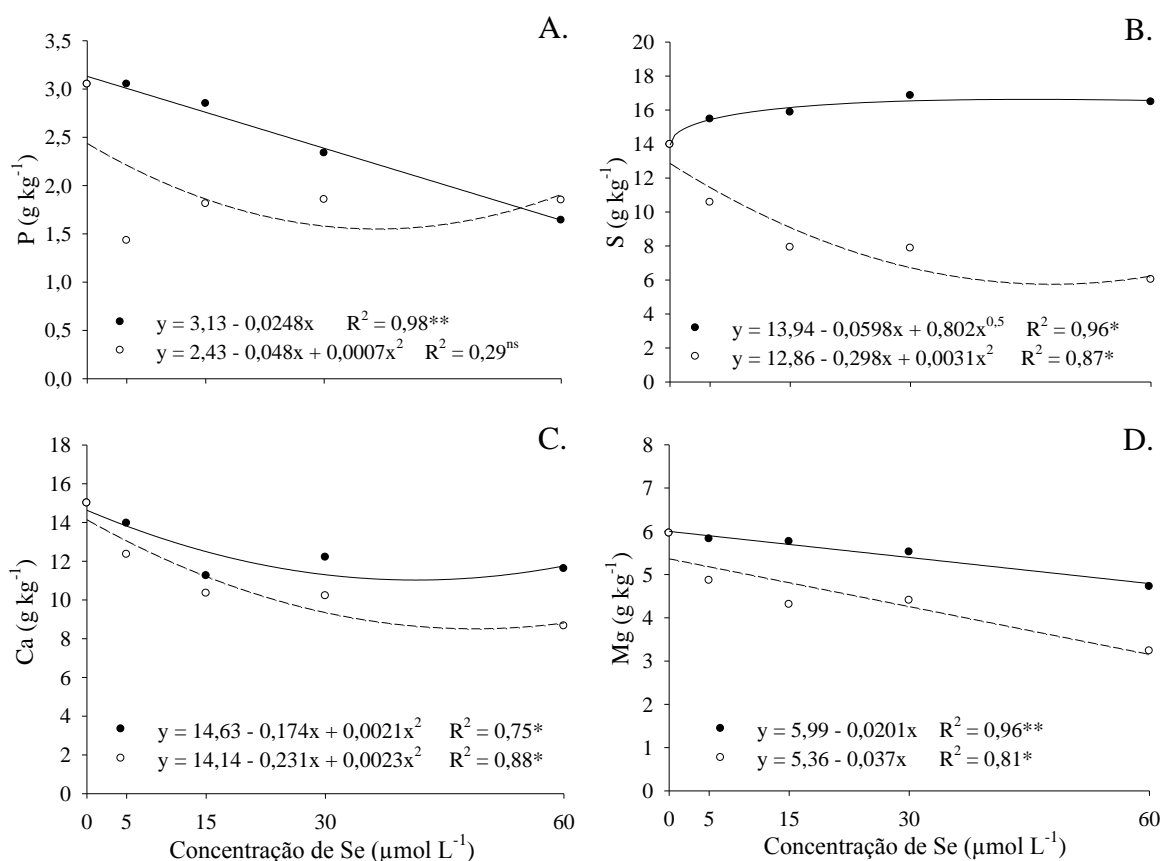


Figura 3. Efeito das concentrações e fontes de Se (● selenato; ○ selenito) no teor de macronutrientes na folha diagnóstica de couve-flor cultivada em solução nutritiva.

Resposta diferente do teor de S às fontes foi observada ao aumentar a concentração de Se na solução nutritiva (Figura 3B). Constatou-se aumento no teor de S com aplicação de selenato até a concentração de 45 μmol L⁻¹ Se. Por outro lado, com selenito, observou-se redução de 60% nos teores desse macronutriente à medida que se aumentou o fornecimento de Se às plantas até 48 μmol L⁻¹. Os teores de S variaram de 14 a 16,5 g kg⁻¹ em plantas tratadas com selenato e de 6 a 14 g kg⁻¹ com selenito.

O incremento de Se na solução nutritiva, em ambas as fontes, reduziram o teor de Ca, sendo as concentrações de 41,4 e 50,2 μmol L⁻¹, as responsáveis pelos menores valores de Ca em plantas tratadas com selenato e selenito, respectivamente (Figura 3C). O selenato proporcionou teores de Ca (11,6 a 15,0 g kg⁻¹) superiores aos

observados em plantas tratadas com selenito que obtiveram teores de 8,65 a 15,0 g kg⁻¹ ao variar as concentrações de Se de 0 a 60 µmol L⁻¹.

Para Mg, a aplicação de Se reduziu gradativamente os seus teores, independente da fonte de Se utilizada (Figura 3D). O fornecimento de selenito na concentração de 60 µmol L⁻¹ reduziu em 46% o teor de Mg comparado aos encontrados em plantas sem aplicação de Se. No selenato essa redução foi de 21%.

As fontes e concentrações de Se influenciaram os teores dos micronutrientes na folha diagnóstica, exceto os teores de Cu que diferiram apenas no fator concentrações de Se (Tabela 4). O teor de Cu reduziu linearmente com aumento da concentração de Se na solução nutritiva, sendo constatado decréscimo de 25% no teor deste micronutriente em plantas tratadas com 60 µmol L⁻¹ quando comparadas com tratamento controle (0 µmol L⁻¹) (Figura 4B).

Tabela 4. Resumo da análise de variância para teor de micronutrientes na folha diagnóstica da couve-flor em função de fontes e concentrações de Se.

Causa da Variação	Teor micronutrientes				
	B	Cu	Fe	Mn	Zn
Fontes Se (F)	8,24** ¹	25,37**	42,61**	10,13**	29,45**
Concentração Se (C)	1,99 ^{ns}	2,26 ^{ns}	8,78**	14,00**	9,50**
F x C	2,12 ^{ns}	1,72 ^{ns}	3,77**	0,88 ^{ns}	9,76**
CV (%)	11,2	22,1	16,8	15,9	12,3
Fontes de Se	Média dos Teores (mg kg ⁻¹)				
Selenato	52,82 a	15,57 a	49,22 a	72,11 a	27,78 a
Selenito	47,68 b	10,90 b	34,64 b	61,42 b	22,40 b
DMS	3,62	1,89	4,56	6,86	1,98
Concentrações de Se	Média dos Teores (mg kg ⁻¹)				
0 µmol L ⁻¹	50,10	14,95	52,10	88,97	28,86
5 µmol L ⁻¹	52,16	13,98	46,34	71,32	28,17
15 µmol L ⁻¹	49,67	13,98	40,62	61,45	24,46
30 µmol L ⁻¹	53,27	12,14	37,22	58,79	22,19
60 µmol L ⁻¹	45,96	11,12	33,42	53,17	21,56

¹ Teste F, **: p ≤ 0,01; ns: não significativo; CV: coeficiente de variação; DMS: diferença mínima significativa

O teor de B na folha diagnóstica foi incrementado com a aplicação do selenato até concentração estimada de $31 \mu\text{mol L}^{-1}$ Se, ocorrendo redução em concentrações superiores a esta (Figura 4A). O incremento de Se, na fonte selenito, reduziu o teor de B na folha diagnóstica das plantas de couve-flor, verificando-se teores de 50 e $42,3 \text{ mg kg}^{-1}$ ao variar as concentrações de 0 a $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ Se.

Com relação ao Fe, pequeno aumento no teor foi observado com baixas concentrações de Se na fonte selenato (Figura 4C). Nesta fonte, concentrações superiores à $4 \mu\text{mol L}^{-1}$ Se ocasionaram decréscimo linear nos teores de Fe, com menor teor (38 mg kg^{-1}) obtido na concentração de $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ Se. Em plantas tratadas com selenito, a redução nos teores de Fe foi mais acentuada, observando-se máximo decréscimo de 60% com $39 \mu\text{mol L}^{-1}$ Se. Os teores de Fe obtidos com esta fonte (52 a $28,5 \text{ mg kg}^{-1}$) foram inferiores aos observados com selenato (52 a 38 mg kg^{-1}).

Os teores de Mn e Zn diminuíram com fornecimento de selenato (Figura 4D e E). A concentração de $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ Se promoveu reduções de 33% e 29% nos teores de Mn e Zn, respectivamente. Em plantas que receberam selenito na solução nutritiva, os teores desses micronutrientes foram inferiores aos constatados com selenato, verificando-se menores valores para Mn e Zn nas concentrações de Se estimadas de 43 e $32 \mu\text{mol L}^{-1}$.

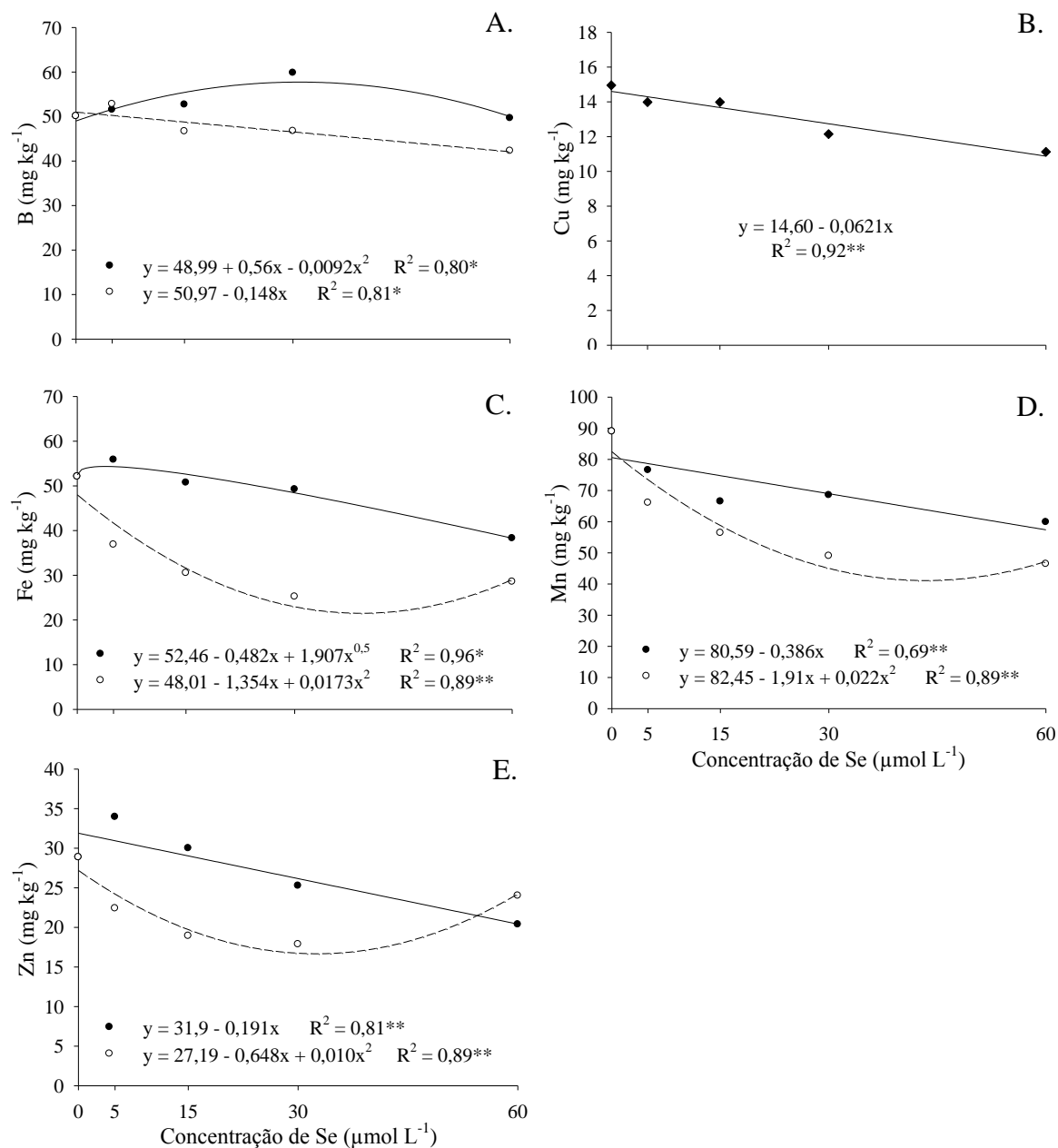


Figura 4. Efeito das concentrações e fontes de Se (● selenato; ○ selenito) no teor de micronutrientes na folha diagnóstica de couve-flor cultivada em solução nutritiva. ◆ Média entre as fontes de Se.

2.3.3 Teor e acúmulo de nutrientes na inflorescência

O teor de P e Cu na inflorescência diferiram quanto às fontes de Se utilizadas e apenas os teores de Mg, B e Cu foram influenciados pelas concentrações de Se (Tabela 5). Efeito da interação entre fontes e concentrações de Se foi constatado nos teores de N, S, Fe e Mn. Os nutrientes K, Ca, e Zn não foram influenciados pelos fatores. Maior teor de P ($3,0 \text{ g kg}^{-1}$) foi obtido em plantas tratadas com selenito, apresentando diferença de 19% em relação ao teor obtido com selenato ($2,5 \text{ g kg}^{-1}$) (Tabela 5).

O teor de N na inflorescência aumentou com a aplicação de Se na solução nutritiva, seja na fonte selenato ou selenito, com máximos teores encontrados nas concentrações de 60 e 31 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Se para selenato e selenito, respectivamente (Figura 5A). Verificou-se efeito inverso do aumento de Se no teor de S em relação às fontes de Se (Figura 5B), sendo que o aumento na concentração até 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Se proporcionou o máximo e o mínimo teor de S com selenito e selenato, respectivamente. Contudo, na concentração de 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Se, os teores de S em plantas cultivadas com selenito ($7,4 \text{ g kg}^{-1}$) e selenato ($7,0 \text{ g kg}^{-1}$) foram praticamente iguais entre si e também semelhantes às plantas não tratadas com Se ($6,9 \text{ g kg}^{-1}$).

Tabela 5. Resumo da análise de variância para teor de nutrientes na inflorescência da couve-flor em função de fontes e concentrações de Se.

Causa da Variação	Teor nutrientes										
	N	P	S	K	Ca	Mg	B	Cu	Fe	Mn	Zn
Fontes Se (F)	0,95 ^{ns1}	7,93 ^{**}	65,8 ^{**}	3,14 ^{ns}	2,55 ^{ns}	0,97 ^{ns}	1,17 ^{ns}	5,48 [*]	67,8 ^{**}	56,0 ^{**}	1,09 ^{ns}
Concentração Se (C)	4,55 ^{**}	0,77 ^{ns}	1,27 ^{ns}	2,08 ^{ns}	0,87 ^{ns}	1,92 [*]	2,18 [*]	7,6 ^{**}	11,5 ^{**}	1,6 ^{ns}	0,68 ^{ns}
F x C	3,30 ^{**}	0,76 ^{ns}	13,7 ^{**}	1,09 ^{ns}	0,54 ^{ns}	0,19 ^{ns}	0,21 ^{ns}	0,6 ^{ns}	6,6 ^{**}	9,5 ^{**}	0,17 ^{ns}
CV (%)	6,4	20,9	14,1	15,1	16,5	12,8	6,2	10,1	11,8	11,4	13,5
Fontes de Se	Média dos macronutrientes (g kg ⁻¹)					Média dos micronutrientes (mg kg ⁻¹)					
Selenato	42,4 a	2,5 b	5,9 b	26,1 a	4,4 a	2,1 a	35,8 a	8,3 a	31,6 a	17,8 b	29,7 a
Selenito	43,3 a	3,0 a	8,5 a	24,0 a	4,8 a	2,2 a	35,1 a	7,7 b	23,2 b	23,4 a	28,4 a
DMS	1,78	0,37	0,65	2,44	0,49	0,18	1,42	0,52	2,08	1,52	2,54
Concentrações Se	Média dos macronutrientes (g kg ⁻¹)					Média dos micronutrientes (mg kg ⁻¹)					
0 µmol L ⁻¹	39,60	2,89	6,94	22,10	4,82	2,31	34,17	9,34	21,75	19,3	28,6
5 µmol L ⁻¹	42,45	2,76	6,97	26,76	4,70	2,23	36,15	7,98	25,17	19,8	30,8
15 µmol L ⁻¹	43,27	2,81	6,96	26,78	4,33	2,12	36,56	7,63	28,71	20,6	29,6
30 µmol L ⁻¹	45,24	2,43	7,88	25,01	4,32	2,07	36,09	7,53	30,72	21,5	28,5
60 µmol L ⁻¹	43,73	2,77	7,14	24,59	4,81	1,97	34,21	7,43	30,67	21,7	27,9

¹ Teste F, **: p ≤ 0,01; *: p ≤ 0,05; ns: não significativo; CV: coeficiente de variação; DMS: diferença mínima significativa

As crescentes concentrações de Se na solução nutritiva afetaram os teores de Mg e B na inflorescência, com ajustes linear e quadrático, respectivamente. Altas concentrações de Se reduziu levemente os teores de Mg na inflorescência, que variaram de 2,3 a 2,0 g kg⁻¹ nas concentrações de 0 a 60 µmol L⁻¹ Se (Figura 5C). Apesar do máximo teor de B ter sido encontrado com concentração de 27 µmol L⁻¹ Se, a variação foi pequena entre os teores observados (34,2 a 36,6 mg kg⁻¹) com as concentrações de Se de 0 a 60 µmol L⁻¹ (Figura 5D).

Maior teor de Cu na inflorescência (8,3 mg kg⁻¹) foi obtido com aplicação de selenato, constatando-se diferença de 8% em relação ao teor de plantas tratadas com selenito (7,7 mg kg⁻¹). O aumento na concentração de Se até 40 µmol L⁻¹ reduziu em 23% o teor desse micronutriente, com valor de 7,2 mg kg⁻¹ (Figura 5E). O selenato promoveu incremento de 84% no teor de Fe na inflorescência das plantas tratadas com 39 µmol L⁻¹ Se. No entanto, em concentrações superiores a esta houve redução nos teores de Fe (Figura 5F). Os teores de Fe obtidos na inflorescência das plantas tratadas com selenito foram inferiores aos encontrados com selenato, apesar de aumentarem com as aplicações crescentes de Se na solução nutritiva.

O aumento da concentração de 0 para 60 µmol L⁻¹ Se, na fonte selenito, promoveu incremento no teor de Mn na inflorescência, com valores entre 19,3 a 28,3 mg kg⁻¹ (Figura 5G). Resultado inverso foi observado ao se aplicar selenato, que reduziu o teor de Mn ao aumentar as concentrações de Se. Na concentração de 60 µmol L⁻¹ Se, o teor de Mn com selenito foi 88% maior que com selenato.

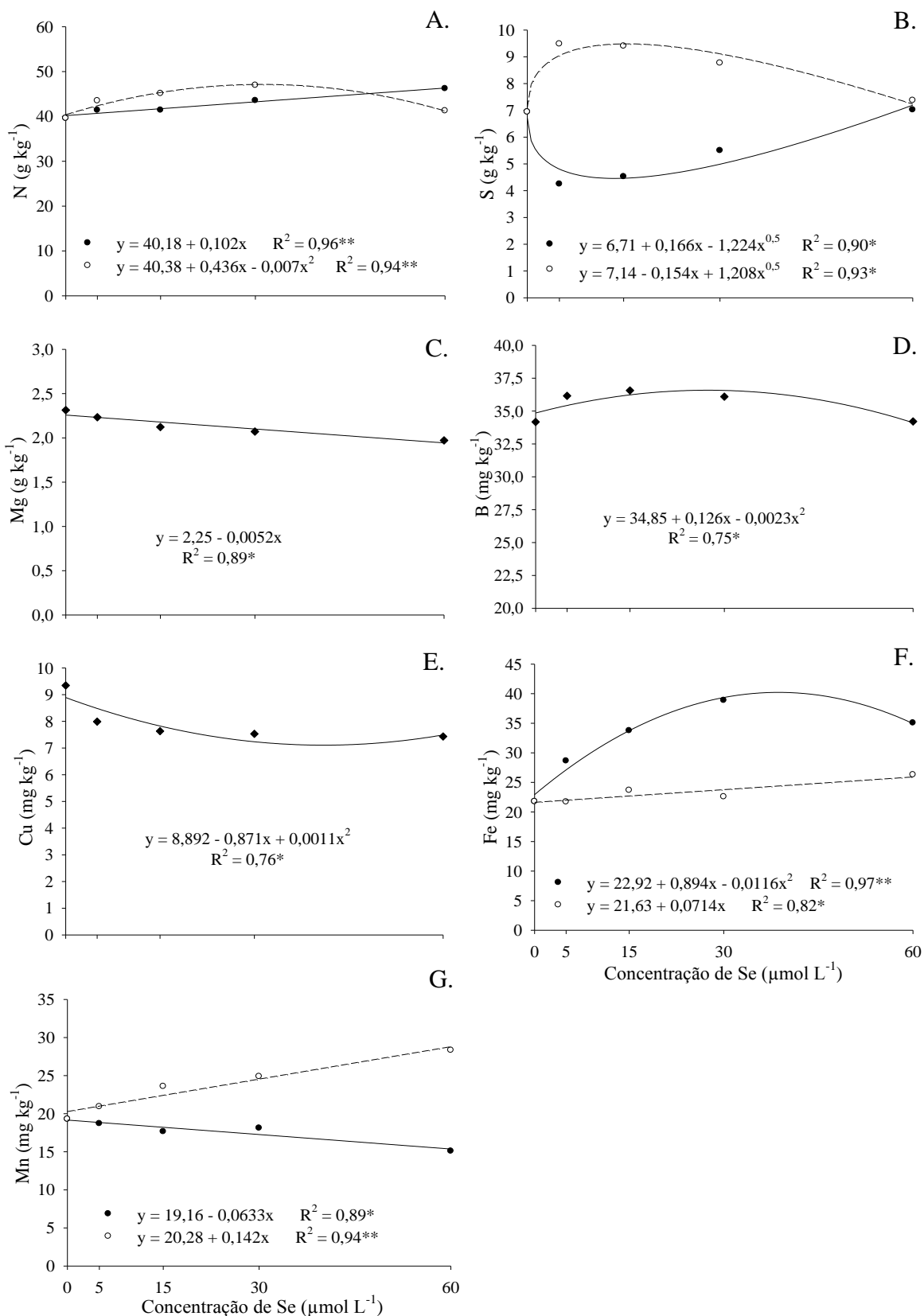


Figura 5. Teor de nutrientes na inflorescência de couve-flor em função de fontes (● selenato; ○ selenito) e concentrações de Se. ◆ Média entre as fontes de Se.

O acúmulo de N na inflorescência foi afetado apenas pelas concentrações de Se (Tabela 6). No entanto, em ambas as fontes de Se, o acúmulo desse macronutriente teve ajuste quadrático ao aumentar as concentrações de Se. Os maiores acúmulos encontrados foram obtidos com o fornecimento de selenito (Figura 6A). O ponto de máximo acúmulo de N foi obtido nas concentrações de 28 e 29 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Se para selenato (3.046,0 mg planta^{-1}) e selenito (3.249,0 mg planta^{-1}), respectivamente. Essas quantidades corresponderam a acréscimos de 42%, com selenato, e de 52%, com selenito, em relação às quantidades acumuladas em plantas não tratadas com Se. Notou-se ainda, que independente da fonte de Se aplicada, concentrações acima de 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Se causaram redução no acúmulo de N nas plantas de couve-flor.

O acúmulo de P na inflorescência foi afetado apenas pelas fontes de Se (Tabela 6). Maior acúmulo de P (183,4 mg planta^{-1}) foi encontrado com selenito, que diferiu em 26% em relação ao acúmulo encontrado com selenato (145,1 mg planta^{-1}).

As fontes e concentrações de Se e a interação desses fatores influenciaram no acúmulo de S na inflorescência (Tabela 6). Máximo acúmulo de S na inflorescência também foi constatado quando tratou-se as plantas com selenito, atingindo, na concentração de 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Se, acréscimo de 68% (Figura 6B). A partir desta concentração, verificou-se perda na quantidade de S acumulado na inflorescência, chegando a reduzir 40% com aplicação de 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Se. Na fonte selenato, a concentração de 11 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Se proporcionou menor acúmulo de S (301,0 mg planta^{-1}) na inflorescência. Porém houve aumento no acúmulo desse nutriente quando as concentrações de Se disponível na solução nutritiva foram superiores a 11 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Os nutrientes catiônicos K e Mg foram afetados significativamente apenas pelas concentrações de Se, enquanto que para o acúmulo de Ca não houve efeito significativo com aplicação das fontes e concentrações de Se (Tabela 6). Os nutrientes K e Mg acumularam-se na inflorescência da couve-flor com aplicação de Se nas concentrações de 15 e 22 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, sendo encontrados os acúmulos máximos de 1.826,0 e 147,0 mg planta^{-1} de K e Mg (Figura 6C e D). Decréscimos de 38% no acúmulo de K e Mg foram constatados com 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Se.

Tabela 6. Resumo da análise de variância para acúmulo de nutrientes na inflorescência da couve-flor em função de fontes e concentrações de Se.

Causa da Variação	Acúmulo nutrientes										
	N	P	S	K	Ca	Mg	B	Cu	Fe	Mn	Zn
Fontes Se (F)	2,42 ^{ns1}	6,65*	44,12**	0,54 ^{ns}	3,02 ^{ns}	1,64 ^{ns}	0,33 ^{ns}	0,15 ^{ns}	12,22**	25,67**	0,01 ^{ns}
Concentração Se (C)	9,92**	1,90 ^{ns}	6,50**	5,52**	1,51 ^{ns}	5,59**	10,13**	4,60**	7,63**	5,46**	6,79**
F x C	0,92 ^{ns}	0,67 ^{ns}	5,75**	1,32 ^{ns}	0,06 ^{ns}	0,49 ^{ns}	0,40 ^{ns}	0,54 ^{ns}	3,41**	2,83*	0,52 ^{ns}
CV (%)	16,7	28,5	20,9	25,7	26,0	21,1	16,3	20,4	24,7	19,4	19,9
Fontes de Se	Média acúmulo (mg planta ⁻¹)										
Selenato	2679,6 a	145,1 b	337,5 b	1561,3 a	255,4 a	123,3 a	2099,9 a	484,4 a	1875,6 a	1048,6 b	1737,6 a
Selenito	2467,9 a	183,4 a	527,4 a	1471,1 a	294,7 a	134,2 a	2163,4 a	472,4 a	1425,3 b	1435,4 a	1750,3 a
DMS	277,7	30,3	58,4	251,8	46,2	17,6	224,0	63,1	263,1	155,9	224,9
Concentrações Se	Média acúmulo (mg planta ⁻¹)										
0 µmol L ⁻¹	2140,8	156,4	376,4	1194,7	261,5	125,5	1838,2	507,4	1172,3	1044,1	1545,1
5 µmol L ⁻¹	2659,8	175,5	443,7	1688,8	295,4	140,7	2262,5	500,5	1569,7	1245,8	1931,9
15 µmol L ⁻¹	2927,8	190,8	463,6	1826,2	289,5	144,2	2453,8	514,8	1952,7	1384,3	2000,8
30 µmol L ⁻¹	2927,1	168,6	544,7	1733,6	301,9	143,3	2493,2	522,4	2148,6	1489,7	1967,6
60 µmol L ⁻¹	2024,2	129,9	333,9	1137,6	226,7	90,4	1610,7	346,6	1408,9	1046,3	1274,2

¹ Teste F, **: p ≤ 0,01; *: p ≤ 0,05; ns: não significativo; CV: coeficiente de variação; DMS: diferença mínima significativa

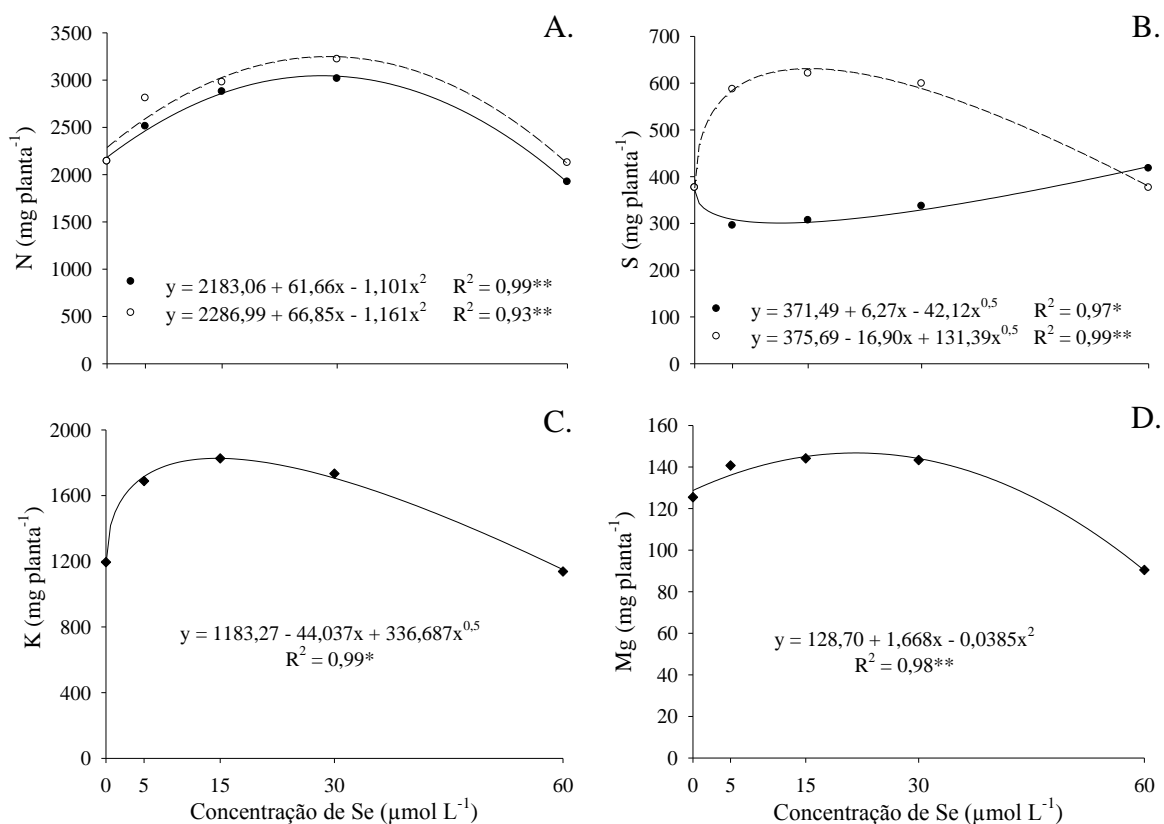


Figura 6. Acúmulo de macronutrientes na inflorescência de couve-flor em função de fontes (● selenato; ○ selenito) e concentrações de Se. ♦ Média entre as fontes de Se.

As concentrações de Se influenciaram o acúmulo de B, Cu e Zn na inflorescência da couve-flor (Tabela 6). Para Fe e Mn o acúmulo foi afetado pela interação entre as fontes e concentrações de Se (Tabela 6).

O B foi acumulado na inflorescência até concentração de 26 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Se, ocorrendo redução na quantidade acumulada com aplicação de 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Se (Figura 7A). Constata-se que baixas concentrações de Se refletiu-se timidamente no acúmulo de Cu (Figura 7B). Contudo, concentrações de Se superiores a 18 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Se foram responsáveis pela diminuição do acúmulo desse micronutriente, reduzindo em 34% seu acúmulo na inflorescência.

A quantidade de Fe acumulada na inflorescência das plantas foi maior com aplicação de selenato. Entretanto, independente da fonte de Se, a concentração de

30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Se promoveu máximo acúmulo de Fe, com incremento de 132%, no selenato, e 45%, com selenito, em relação aos acúmulos obtidos no tratamento controle (Figura 7C). A concentração de 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Se, em ambas as fontes, reduziu a quantidade de Fe na inflorescência, com valores próximos aos encontrados no tratamento controle.

O selenito aumentou o acúmulo de Mn com valor máximo de 1,8 mg planta⁻¹ quando forneceu 37 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Se às plantas de couve-flor (Figura 7D). Com selenato o Mn acumulado na inflorescência teve pouca variação com concentrações de Se inferiores à 21 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Se, mas com elevadas concentrações de Se houve drástica redução no acúmulo de Mn.

Para o acúmulo de Zn na inflorescência, o aumento na concentração de Se na solução nutritiva promoveu acúmulo do elemento até a concentração de 26 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Se (Figura 7E). Entretanto, em concentrações superiores a esta se evidenciou decréscimos no acúmulo de Zn.

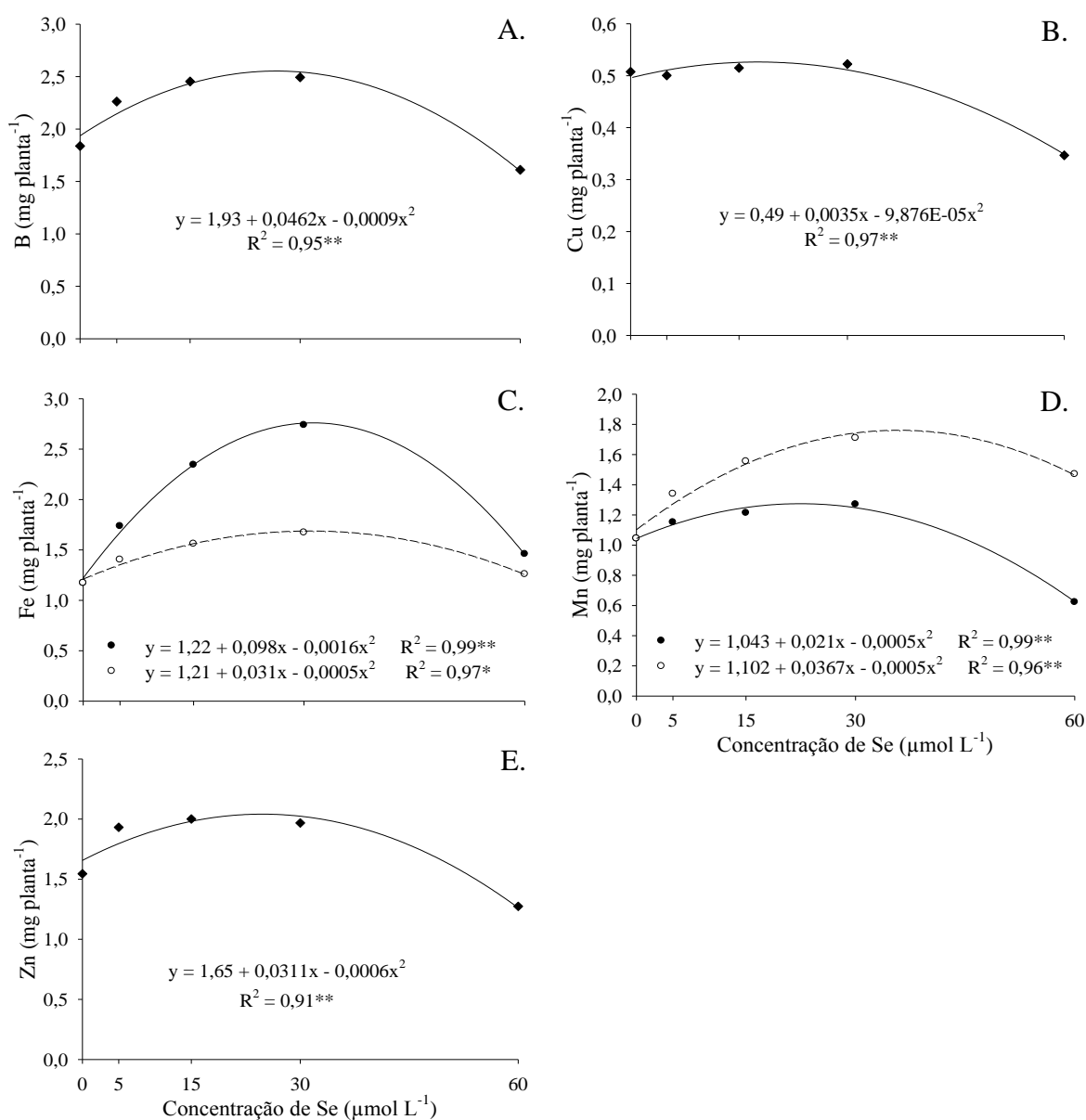


Figura 7. Acúmulo de micronutrientes na inflorescência de couve-flor em função de fontes (● selenato; ○ selenito) e concentrações de Se. ◆ Média entre as fontes de Se.

2.3.4 Partição de massa seca e massa da inflorescência

A massa fresca da inflorescência e a matéria seca das partes da couve-flor foram influenciadas pelo fornecimento de Se na solução nutritiva. A massa seca de raiz (MSR) não diferiu entre as fontes de Se (Tabela 7), mas aumentou quando a

concentração de Se foi incrementada até 35 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 8A). A massa seca de caule (MSC) não foi influenciada pelos tratamentos fontes e concentrações de Se (Tabela 7).

Tabela 7. Resumo da análise de variância para massa seca de raiz, folha, caule e inflorescência e massa fresca da inflorescência de plantas de couve-flor em função de fontes e concentrações de Se.

Causa da Variação	MSR	MSC	MSF	MSI	MFI
Fontes Se (F)	0,21 ^{ns1}	1,23 ^{ns}	24,88 ^{**}	0,96 ^{ns}	0,74 ^{ns}
Concentração Se (C)	7,25 ^{**}	1,66 ^{ns}	5,94 ^{**}	6,69 ^{**}	14,04 ^{**}
F x C	0,44 ^{ns}	1,26 ^{ns}	3,81 ^{**}	0,53 ^{ns}	2,02 ^{ns}
CV (%)	12,3	10,9	9,16	16,9	11,2
Fontes de Se		Média das massas (g planta ⁻¹)			
Selenato	16,5 a	27,6 a	222,3 a	58,5 a	895,4 a
Selenito	16,3 a	26,5 a	192,4 b	61,6 a	923,0 a
DMS	1,28	1,90	12,3	6,57	65,3
Concentrações de Se		Média das massas (g planta ⁻¹)			
0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	13,8	27,64	207,1	54,0	952,6
5 $\mu\text{mol L}^{-1}$	15,4	27,82	213,5	62,6	1034,8
15 $\mu\text{mol L}^{-1}$	17,7	27,55	228,3	67,5	995,5
30 $\mu\text{mol L}^{-1}$	18,8	27,64	204,7	69,1	865,9
60 $\mu\text{mol L}^{-1}$	16,4	24,67	183,1	47,1	697,3

¹ Teste F, **: $p \leq 0,01$; ns: não significativo; CV: coeficiente de variação; DMS: diferença mínima significativa; MSR: massa seca de raiz; MSC: massa seca de caule; MSF: massa seca de folhas; MSI: massa seca da inflorescência; MFI: massa fresca da inflorescência

Na massa seca de folhas (MSF) houve efeito dos tratamentos e interação entre fontes e concentrações de Se (Tabela 7). A MSF aumentou com o fornecimento de Se na fonte selenato, com resposta quadrática ao aumentar as concentrações de Se (Figura 8B). A maior MSF (246 g planta⁻¹) foi obtida na concentração de 30,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Se, a qual foi próxima das concentrações que maximizaram a MSR e massa seca de inflorescência (MSI). Por outro lado, o aumento das concentrações de Se, na fonte selenito, reduziu linearmente a MSF, com maior decréscimo com 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Se.

Entre as fontes de Se, a MSI não foi diferenciada (Tabela 7), mesmo com o incremento das concentrações de Se (Figura 8C). Entretanto, a aplicação das concentrações de Se influenciaram a MSI (Tabela 7), com máximo valor encontrado na concentração de $26 \mu\text{mol L}^{-1}$ Se com selenato, e $28 \mu\text{mol L}^{-1}$ Se na fonte selenito. As plantas tratadas nas concentrações superiores a estas apresentaram redução na MSI, sendo os menores resultados constatados com $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ Se.

A massa fresca da inflorescência (MFI) da couve-flor não diferiu entre as fontes de Se, porém as concentrações de Se afetaram a MFI (Tabela 7). Verificou-se que baixas concentrações de Se, em ambas as fontes, até $5 \mu\text{mol L}^{-1}$, aumentou a massa da inflorescência (Figura 8D), enquanto concentrações superiores promoveram redução. Na maior concentração de Se ($60 \mu\text{mol L}^{-1}$ Se), a fonte selenito promoveu maior massa fresca da inflorescência em relação ao selenato.

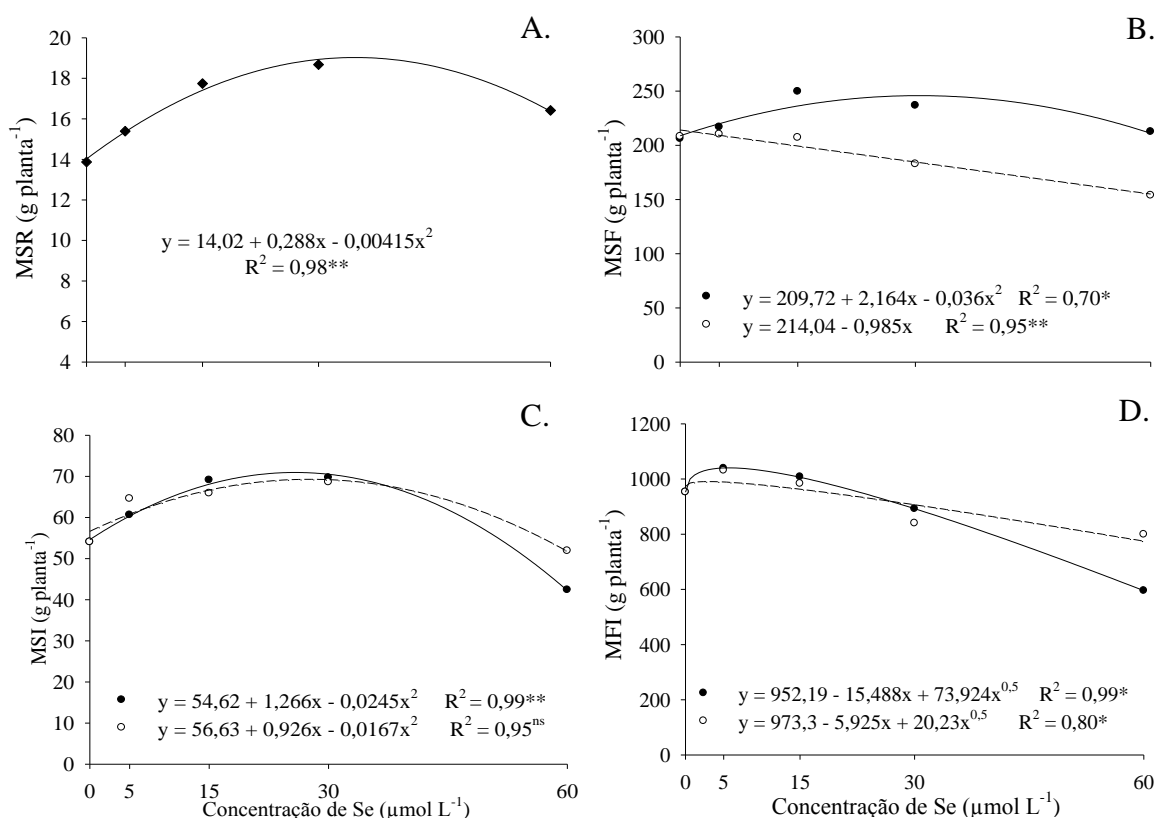


Figura 8. Efeito das concentrações e fontes de Se (● selenato; ○ selenito) na massa seca das partes da planta e massa fresca da inflorescência de couve-flor cultivada em solução nutritiva. ◆ Média entre as fontes de Se.

2.3.5 Índices de eficiência

As plantas de couve-flor foram mais eficientes em absorver Se (EA_{Se}) quando disponível na fonte de selenato (Figura 9A). Entretanto, em ambas as fontes, as concentrações crescentes de Se promoveram aumento na EA_{Se} pela planta de couve-flor. Com selenato, a máxima eficiência estimada foi de 128 mg g^{-1} Se aplicado quando aplicou-se a concentração de $30 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ Se, e com selenito registrou-se EA_{Se} de 62 mg g^{-1} na concentração de $20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ Se.

A eficiência de translocação de Se (ET_{Se}) na fonte selenato foi superior que a de selenito, não diferindo entre as concentrações de 5 a $60 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ Se na solução nutritiva (Figura 9B). Na aplicação de selenito, as plantas de couve-flor transferiram para a parte aérea, em média, 55% do Se absorvido. Quando se utilizou selenato, a eficiência de translocação de Se foi em torno de 99%.

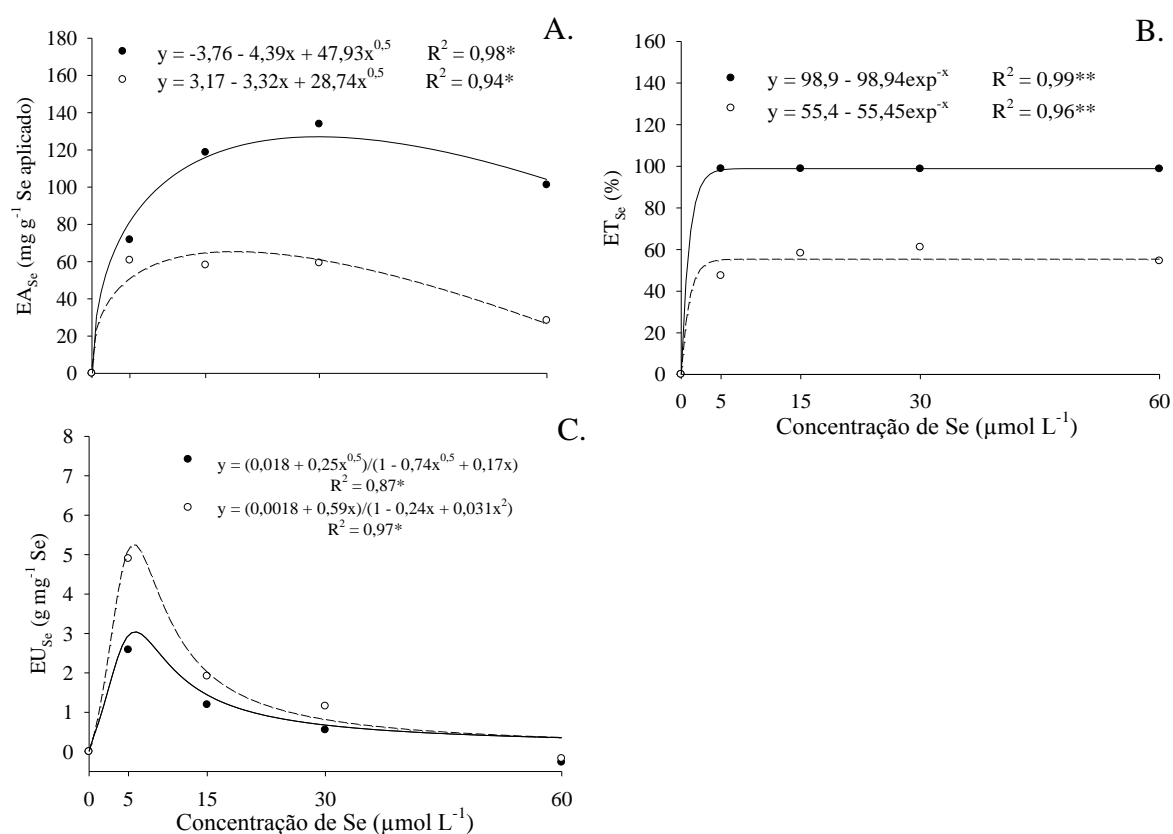


Figura 9. Eficiência de absorção de Se – EA_{Se} (A) e translocação de Se – ET_{Se} (B) na planta e eficiência de utilização de Se na inflorescência – EU_{Se} (C) de couve-flor em função de fontes (\bullet selenato; \circ selenito) e concentrações de Se.

A eficiência de utilização de Se na inflorescência (EU_{Se}) expressa à capacidade da planta em empregar o nutriente absorvido na síntese de biomassa. Nesse sentido, a conversão de Se em inflorescência pela planta foi maior com selenito, evidenciando-se índices de utilização superiores aos encontrados com selenato (Figura 9C). Percebe-se, em ambas as fontes, melhores índices de eficiência de utilização com $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ Se, ocorrendo redução ao aumentar a concentração de Se na solução nutritiva. Na maior concentração de Se ($60 \mu\text{mol L}^{-1}$ Se) não houve EU_{Se} , sendo que os valores obtidos foram negativos para as fontes selenato e selenito.

2.4 DISCUSSÃO

O objetivo da biofortificação é aumentar o teor de determinado elemento na planta, principalmente em sua parte comestível, sem provocar desequilíbrios nutricionais e/ou redução na produção. No presente estudo, o teor de Se na planta foi incrementado quando se aplicaram concentrações crescentes de Se nas fontes selenato e selenito (Figura 2A e 2B), concordando com resultados obtidos em outros trabalhos (RAMOS et al., 2011; HAWRYLAK-NOWAK, 2013; BAÑUELOS et al., 2016; BOLDRIN et al., 2016).

Para efeito de biofortificação da inflorescência da couve-flor, a aplicação de selenato na solução nutritiva promoveu maiores teores do elemento na inflorescência e também elevado acúmulo de Se na parte aérea das plantas. O teor de Se na inflorescência das plantas biofortificadas variou de 42 a 1.017 mg kg^{-1} Se na massa seca (MS) em plantas tratadas com selenato e 33 a 232 mg kg^{-1} MS com selenito. Estes teores obtidos na inflorescência foram muito acima do limite permitido em alimentos pelo *Codex Alimentarius*. Fato que está relacionado com as elevadas concentrações de Se fornecidas na solução nutritiva e o longo período de exposição (50 dias) desse elemento às plantas de couve-flor, o que permitiu maior absorção e acúmulo do elemento pelas plantas.

Nesse contexto, estudos devem ser realizados a fim de avaliar concentrações menores de Se na solução nutritiva, assim como o início do fornecimento desse elemento às plantas. Uma vez que, neste trabalho, o Se foi fornecido a partir de 15

dias após transplante das plantas para os canais hidropônicos (PVC), quando a planta apresentava 12 folhas e estava a 35 dias da emissão da inflorescência. Desse período até a colheita da inflorescência, a solução nutritiva foi renovada oito vezes e, portanto, também renovado o fornecimento de Se às plantas. Assim, para os tratamentos com as concentrações de 5, 15, 30 e 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Se na solução nutritiva, foram aplicadas 36, 107, 213 e 426 mg de Se por planta durante o ciclo de cultivo, respectivamente. Dessa maneira, talvez o fornecimento de Se somente após a visualização ou emissão da inflorescência determinará menor período de absorção e translocação do Se para a inflorescência, o que proporcionará teores de Se dentro do padrão aceitável pelo *Codex Alimentarius*, tornando a couve-flor biofortificada com Se uma possível alternativa para aumentar a ingestão de Se na população brasileira, a qual apresenta indicativo de baixo consumo desse elemento (FERREIRA et al., 2002; REIS et al., 2014).

Estudos têm confirmado a eficácia do selenato no enriquecimento de Se em plantas, principalmente, da família *Brassicaceae* como repolho (MECHORA et al., 2011), brócolis (SINDELÁROVÁ et al., 2015) e couve (LEFSRUD et al., 2006). O selenato por competir prontamente com sulfato é ativamente absorvido pelas plantas através de transportadores de sulfato, enquanto o selenito acredita-se ser absorvido de forma passiva e por transportadores de fosfato (WHITE et al., 2004; LI; MCGRATH; ZHAO, 2008). Geralmente, a absorção de selenato é bem maior que a de selenito (WHITE et al., 2004), fato que foi evidenciado no presente estudo (Figura 9A), em que as plantas de couve-flor absorveram 2 vezes mais Se quando fornecido na fonte selenato e em concentrações superiores a 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Se, constatando-se maior eficiência.

O selenato por ser facilmente translocado na planta contribuiu para os elevados teores e acúmulos encontrados na parte aérea da couve-flor (Figura 2A e 2C). Cerca de 99% do Se absorvido, nesta fonte, independente da concentração aplicada na solução nutritiva, foi transferido para a parte aérea das plantas. Com selenito, a translocação de Se foi menor, uma vez que grande parte do selenito é retido nos tecidos radiculares devido encontrar-se em uma forma química mais reduzida, sendo rapidamente incorporado em compostos organoselênicos (WHITE et al., 2004; WHITE, 2016). Este fato explica os maiores teores e acúmulos de Se encontrados

nas raízes de couve-flor quando tratadas com selenito (Figura 2B e 2D), forma química rapidamente assimilada em selenoaminoácidos nos tecidos da raiz, conferindo baixa quantidade no transporte xilemático, o que resulta em taxas inferiores de translocação (LI; MCGRATH; ZHAO, 2008; GUERRERO et al., 2014).

A biofortificação de plantas com Se pode, indiretamente, ocasionar possíveis alterações no balanço nutricional, afetando o crescimento e a produção. Neste trabalho, ficou evidente que as plantas biofortificadas com elevadas concentrações de Se, principalmente na fonte selenito, diminuíram o teor de P, S, Ca, Mg, B, Cu, Fe, Mn e Zn na folha diagnóstica (Figuras 3 e 4), afetando processos metabólicos, que reflete na redução do crescimento e produtividade da couve-flor. Fato que foi constatado com o decréscimo da MSF, MSI e MFI quando aplicou-se concentrações superiores à 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Se na fonte selenito (Figura 8).

A redução de P verificada na folha diagnóstica com o aumento de Se pode prejudicar diversos processos celulares, já que este elemento está envolvido no transporte de energia e liga-se a muitas moléculas essenciais, como ácidos nucleicos e fosfolipídeos (DRAHOŇOVSKÝ et al., 2016). Devido à semelhança química entre fosfato e selenito, há uma competição de íons (HOPPER; PARKER, 1999; LI; MCGRATH; ZHAO, 2008), que se elevada e associada a outras interações metabólicas, podem diminuir a absorção de P e seu teor no tecido foliar.

O metabolismo de Se e S estão intimamente relacionados devido a semelhança química existente, permitindo competirem pelos mesmos sítios metabólicos na planta (WHITE et al., 2004; WHITE, 2016). No presente estudo, o teor de S aumentou nas plantas de couve-flor tratadas com selenato e diminuiu com selenito (Figura 3B), sugerindo relação sinérgica entre selenato e S, também relatada por Rios et al. (2013), Ribeiro et al. (2016) e Boldrin et al. (2016). O sulfato inibe a absorção de selenato na rizosfera; porém, o selenato nessa região promove a absorção de sulfato, ocorrendo acúmulo de S em órgãos da parte aérea, o que evita, provavelmente, a redução na abundância e/ou atividade dos transportadores de sulfato por meio de sulfato e seus derivados (WHITE et al., 2004). Entretanto, a absorção de S estimulada pela indução do selenato pode ser uma toxicidade incipiente de Se, que reduziu o crescimento das plantas, evento observado quando aplicou concentração de 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Se.

As reduções nos teores Ca e Mg, observadas nas Figuras 3C e 3D, indicam provável toxicidade de Se com danos à membrana celular. Estes macronutrientes por atuarem diretamente na constituição da parede celular e da clorofila, respectivamente, afetam o crescimento da planta. Esse fato está associado à pequena produção de matéria seca da couve-flor encontrada com a aplicação de elevadas concentrações de Se na solução nutritiva.

Os decréscimos nos teores de Cu, Mn, Fe e Zn promovidos por concentrações superiores à $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ Se (Figura 4), principalmente com selenito, podem ser atribuídos ao efeito antagônico do Se com esses micronutrientes, fato também evidenciado por Feng et al. (2009). Esta redução afeta o mecanismo de defesa da planta, devido a esses nutrientes estarem diretamente relacionados com a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD). A explicação para o selenito promover menores teores de macronutrientes e micronutrientes na folha diagnóstica, quando comparado ao selenato (Figuras 3 e 4), seria devido esta forma de Se, quando presente no interior vegetal, alterar o coeficiente de permeabilidade de íons na membrana plasmática e, conseqüentemente, afetar a absorção, o transporte e o acúmulo de nutrientes nas células vegetais (PAZURKIEWICZ-KOCOT; KITA; PIETRUSZKA, 2008). Neste sentido, a mudança na capacidade de transporte de íons é, provavelmente, um dos primeiros sintomas observados dos efeitos de Se nas plantas.

O Se estimulou o crescimento das plantas e incrementou a massa seca e massa fresca da inflorescência da couve-flor com aplicação de baixas concentrações (Figura 8). Contudo, estas variáveis foram inibidas em altas concentrações, evidenciando que, dependendo da fonte e concentração de Se, há um duplo efeito do Se. Com o fornecimento de selenato, o nível crítico de toxicidade foi de $5,1 \mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto para selenito foi de $2,6 \mu\text{mol L}^{-1}$, o que confere ao selenito maior efeito fitotóxico com redução na massa fresca da inflorescência da couve-flor. O efeito tóxico do Se deriva, principalmente, da interferência de Se no metabolismo do S e a substituição não específica de aminoácidos sulfurados pelos seus análogos de Se e sua posterior incorporação em proteínas (WHITE et al., 2004; WHITE, 2016). O selenito por ser convertido rapidamente em formas orgânicas de Se, e assim incorporado nas

moléculas de proteínas em substituição ao S, causa toxicidade mais rapidamente quando comparado ao selenato (HOPPER; PARKER, 1999; WHITE et al., 2004).

As plantas de couve-flor converteram eficientemente Se em inflorescência quando selenito foi aplicado na solução nutritiva (Figura 9C). Esse fato pode ser explicado por esta fonte ser facilmente assimilada em formas orgânicas nas raízes, sendo prontamente incorporada como selenoaminoácidos nas proteínas em substituição aos aminoácidos sulfurados (LI; MCGRATH; ZHAO, 2008; GUERRERO et al., 2014). Com selenito, o processo de assimilação de Se exige menos energia da planta comparado ao selenato, que após absorvido pelas raízes precisa ser transferido à parte aérea, onde será convertido em formas orgânicas de Se antes de metabolizado. Assim, devido à rápida incorporação em formas orgânicas, o selenito consegue ser mais tóxico do que o selenato, afetando intensamente a eficiência de utilização de Se pelas plantas. A couve-flor tratada com selenato, apesar de apresentar maior biomassa, foi pouco eficiente na utilização de Se, possivelmente devido a maior absorção, translocação e acúmulo de Se na parte aérea das plantas.

2.5 CONCLUSÕES

5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Se na solução nutritiva proporcionou teor do elemento na inflorescência da couve-flor superior ao limite estabelecido pelo *Codex Alimentarius*.

Altas concentrações de Se, principalmente na fonte selenito, afeta negativamente o crescimento e o teor dos nutrientes na inflorescência, depreciando a qualidade do produto.

O selenato é a fonte que promove maior eficiência de absorção e translocação do elemento na planta, proporcionando elevadas concentrações de Se no tecido vegetal, sendo este um aspecto positivo para programas de biofortificação.

2.6 REFERÊNCIAS

BAÑUELOS, G. S.; ARROYO, I. S.; DANGI, S. R.; ZAMBRANO, M. C. Continued Selenium Biofortification of Carrots and Broccoli Grown in Soils Once Amended with Se-enriched *S. pinnata*. **Frontiers in Plant Science**, London, v. 7, n. August, p. 1–11, 2016.

BARBOSA, J. C.; MALDONATO JÚNIOR, W. **Experimentação Agronômica e Agroestat – Sistema para análises estatísticas de ensaios agronômicos**. 1. ed. Jaboticabal: Gráfica Multipress Ltda, 2015.

BOLDRIN, P. F.; DE FIGUEIREDO, M. A.; YANG, Y.; LUO, H.; GIRI, S.; HART, J. J.; FAQUIN, V.; GUILHERME, L. R. G.; THANNHAUSER, T. W.; LI, L. Selenium promotes sulfur accumulation and plant growth in wheat (*Triticum aestivum*). **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 158, n. 1, p. 80–91, 2016.

DRAHOŇOVSKÝ, J.; SZÁKOVÁ, J.; MESTEK, O.; TREMLOVÁ, J.; KAŇA, A.; NAJMANOVÁ, J.; TLUSTOŠ, P. Selenium uptake, transformation and inter-element interactions by selected wildlife plant species after foliar selenate application. **Environmental and Experimental Botany**, Elmosford, v. 125, p. 12–19, 2016.

FENG, R.; WEI, C.; TU, S. The roles of selenium in protecting plants against abiotic stresses. **Environmental and Experimental Botany**, Elmosford, v. 87, p. 58–68, 2013.

FENG, R.; WEI, C.; TU, S.; WU, F. Effects of Se on the uptake of essential elements in *Pteris vittata* L. **Plant and Soil**, The Hague, v. 325, n. 1, p. 123–132, 2009.

FERREIRA, K. S.; GOMES, J. C.; BELLATO, C. R.; JORDÃO, C. P. Concentrações de selênio em alimentos consumidos no Brasil. **Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health**, Washington, v. 11, n. 3, p. 172–177, 2002.

GUERRERO, B.; LLUGANY, M.; PALACIOS, O.; VALIENTE, M. Dual effects of different selenium species on wheat. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 83, p. 300–307, 2014.

HAMMOND, J. P.; BROADLEY, M. R.; WHITE, P. J.; KING, G. J.; BOWEN, W. C.; HAYDEN, R.; MEACHAM, M. C.; MEAD, A.; OVERS, T.; SPRACKLEN, W. P.; GREENWOOD, D. J. Shoot yield drives phosphorus use efficiency in *Brassica oleracea* and correlates with root architecture traits. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 7, p. 1953–1968, 2009.

HAWRYLAK-NOWAK, B. Comparative effects of selenite and selenate on growth and selenium accumulation in lettuce plants under hydroponic conditions. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 70, n. 2, p. 149–157, 2013.

HAWRYLAK-NOWAK, B.; MATRASZEK, R.; POGORZELEC, M. The dual effects of two inorganic selenium forms on the growth, selected physiological parameters and macronutrients accumulation in cucumber plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 37, n. 2, p. 1–13, 2015.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without

soil. **California Agricultural Experiment Station Circular**, Berkeley, v. 347, n. 347, p. 1–32, 1950.

HOPPER, J. L.; PARKER, D. R. Plant availability of selenite and selenate as influenced by the competing ions phosphate and sulfate. **Plant and Soil**, The Hague, v. 210, n. 2, p. 199–207, 1999.

KOPSELL, D. A.; RANDLE, W. M.; MILLS, H. A. Nutrient accumulation in leaf tissue of rapid-cycling *Brassica oleracea* responds to increasing sodium selenate concentrations. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 23, n. 7, p. 927–935, 2000.

LEFSRUD, M. G.; KOPSELL, D. A.; KOPSELL, D. E.; RANDLE, W. M. Kale carotenoids are unaffected by, whereas biomass production, elemental concentrations, and selenium accumulation respond to, changes in selenium fertility. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 5, p. 1764–1771, 2006.

LI, B.; MCKEAND, S. E.; ALLEN, H. L. Genetic variation in nitrogen use efficiency of loblolly pine seedlings. **Forest science**, Bethesda, v. 37, n. 2, p. 613–626, 1991.

LI, H. F.; MCGRATH, S. P.; ZHAO, F. J. Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite. **New Phytologist**, Cambridge, v. 178, n. 1, p. 92–102, 2008.

LONGCHAMP, M.; ANGELI, N.; CASTREC-ROUELLE, M. Effects on the accumulation of calcium, magnesium, iron, manganese, copper and zinc of adding the two inorganic forms of selenium to solution cultures of *Zea mays*. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 98, p. 128–137, 2016.

MECHORA, Š.; STIBILJ, V.; RADEŠČEK, T.; GABERŠČIK, A.; GERM, M. Impact of se (VI) fertilization on se concentration in different parts of red cabbage plants. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, Helsinki, v. 9, n. 2, p. 357–361, 2011.

MIYAZAWA, M.; PAVAN, M. A.; MURAOKA, T.; CARMO, C. A. F. S.; MELO, W. J. de. Análise química de tecido vegetal. In: SILVA, F. C. DA (Ed.). **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA, 2009. p. 191–233.

PAZURKIEWICZ-KOCOT, K.; KITA, A.; PIETRUSZKA, M. Effect of selenium on magnesium, iron, manganese, copper, and zinc accumulation in corn treated by indole-3-acetic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 39, n. 15–16, p. 2303–2318, 2008.

RAMOS, S. J.; FAQUIN, V.; DE ALMEIDA, H. J.; AVILA, F. W.; GUIMARAES GUILHERME, L. R.; ALVES BASTOS, C. E.; AVILA, P. A. Selenate and Selenite on Yield, Mineral Nutrition and Biofortification With Selenium in Lettuce Cultivars. **Revista Brasileira De Ciencia Do Solo**, Viçosa, v. 35, n. 4, p. 1347–1355, 2011.

REIS, A. R.; FURLANI JUNIOR, E.; MORAES, M. F.; DE MELO, S. P. Biofortificação agrônômica com selênio no Brasil como estratégia para aumentar a qualidade dos produtos agrícolas. **Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas**, Tupã, v. 8, n. 2, p. 128, 9 dez. 2014.

RIBEIRO, D. M.; SILVA JUNIOR, D. D.; CARDOSO, F. B.; MARTINS, A. O.; SILVA, W. A.; NASCIMENTO, V. L.; ARAUJO, W. L. Growth inhibition by selenium is associated with changes in primary metabolism and nutrient levels in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 39, n. 10, p. 2235–2246, 2016.

RIOS, J. J.; BLASCO, B.; LEYVA, R.; SANCHEZ-RODRIGUEZ, E.; RUBIO-WILHELMI, M. M.; ROMERO, L.; RUIZ, J. M. Nutritional Balance Changes in Lettuce Plant Grown Under Different Doses and Forms of Selenium. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 36, n. 9, p. 1344–1354, 2013.

SINDELÁROVÁ, K.; SZÁKOVÁ, J.; TREMLOVÁ, J.; MESTEK, O.; PRAUS, L.; KANA, A.; NAJMANOVÁ, J.; TLUSTOS, P. The response of broccoli (*Brassica oleracea* convar. *italica*) varieties on foliar application of selenium: uptake, translocation, and speciation. **Food Additives & Contaminants: Part A**, Abingdon, v. 32, n. 12, p. 150928143022009, 2015.

TEZOTTO, T.; FAVARIN, J. L.; PAULA NETO, A.; GRATÃO, P. L.; AZEVEDO, R. A.; MAZZAFERA, P. Simple procedure for nutrient analysis of coffee plant with energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry (EDXRF). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 70, n. 4, p. 263–267, 2013.

TRANI, P. E.; RAIJ, B. van. Hortaliças. In: RAIJ, B. VAN; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, Â. M. C. (Ed.). **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. 2. ed. Campinas: Instituto Agrônômico & Fundação IAC, 1997. p. 155–164.

WHITE, P. J. Selenium accumulation by plants. **Annals of Botany**, London, v. 117, n. 2, p. 217–235, 2016.

WHITE, P. J.; BOWEN, H. C.; PARMAGURU, P.; FRITZ, M.; SPRACKLEN, W. P.; SPIBY, R. E.; MEACHAM, M. C.; MEAD, A.; HARRIMAN, M.; TRUEMAN, L. J.; SMITH, B. M.; THOMAS, B.; BROADLEY, M. R. Interactions between selenium and sulphur nutrition in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 404, p. 1927–1937, 2004.

WHITE, P. J.; BROADLEY, M. R. Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets – iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. **New Phytologist**, Cambridge, v. 182, p. 49–84, 2009.

CAPÍTULO 3 – Aumento da capacidade antioxidante em plantas de couve-flor biofortificadas com selênio

RESUMO - Embora não seja essencial as plantas, o Se possui papel importante no metabolismo delas, atuando como antioxidante na proteção contra o estresse oxidativo. Neste estudo, analisou-se o acúmulo de massa seca, parâmetros fisiológicos e atividade de enzimas antioxidantes em plantas de couve-flor cultivadas em hidroponia e suplementadas com fontes (selenato e selenito) e concentrações de Se (0, 5, 15, 30 e 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Verificou-se que a aplicação de Se, em baixas concentrações ($\leq 5 \mu\text{mol L}^{-1}$), promoveu o crescimento das plantas de couve-flor e atuou como antioxidante, exercendo efeito inibitório na formação de espécies reativas de oxigênio (ERO). Esse efeito benéfico foi associado a uma melhora na taxa de fotossíntese e regulação da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione redutase (GR) e ascorbato peroxidase (APX). A inibição da peroxidação lipídica, através da ativação das enzimas, foi mais eficiente com selenato, permitindo manter em alta o poder de redução e eliminação de ERO, aliviando o dano oxidativo nas células.

Palavras-chave: *Brassica oleracea var. botrytis*, selenato, selenito, fotossíntese, peroxidação lipídica

3.1 INTRODUÇÃO

O selênio (Se) é um elemento essencial ao metabolismo humano e animal, atuando como componente de diversas enzimas e proteínas envolvidas na proteção antioxidante (FENG et al., 2015; WHITE, 2016). Sua deficiência na nutrição humana pode acarretar desordens nas funções biológicas do organismo, sendo crucial para incidência de doenças. Nas plantas, o Se não é considerado um elemento essencial, embora possa ser acumulado em grande quantidade nos tecidos vegetais. No entanto, o consumo de plantas enriquecidas em Se constitui uma boa maneira de aumentar a ingestão desse elemento em humanos, com efeitos benéficos para a saúde em longo prazo (PUCCINELLI; MALORGIO; PEZZAROSSA, 2017).

Efeitos benéficos do Se nas plantas têm sido associado à aplicação de baixas concentrações desse elemento, que estimula o crescimento, aumenta a capacidade antioxidante e a tolerância das plantas contra efeitos prejudiciais de estressores, resultando em melhora na produção das plantas (DIAO et al., 2014; ZHANG et al., 2014). Entretanto, em concentrações elevadas o Se pode ser tóxico às plantas, estimulando a oxidação descontrolada e o extravasamento de eletrólitos celular, o que favorece o aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), como ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (OH^{\cdot}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e induz o estresse oxidativo (SHARMA et al., 2012; FENG; WEI; TU, 2013).

O Se, em concentrações adequadas, pode desempenhar um papel importante na diminuição da peroxidação lipídica e no aprimoramento de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos, que tentam minimizar os danos por estresse oxidativo e manter o estado redox da célula (FENG; WEI; TU, 2013; GRATÃO et al., 2015). O sistema de defesa enzimático compreende a atividade de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD, E.C. 1.15.1.1), que converte $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 (GRATÃO et al., 2015; NOCTOR; FOYER, 2016). O H_2O_2 produzido em excesso pode ser convertido em H_2O pela ação das enzimas ascorbato peróxidase (APX, E.C. 1.11.1.11), catalase (CAT, E.C. 1.11.1.6) e glutathione peróxidase (GPX, E.C. 1.11.1.9) (SHARMA et al., 2012). Além disso, mecanismos não enzimáticos capazes de eliminar ERO envolvem compostos como prolina, flavonóides, carotenóides, ascorbato e glutathione (GSH) (SHARMA et al., 2012; GRATÃO et al.,

2015; NOGUEIROL et al., 2015). A regeneração de GSH formada a partir de glutathiona oxidada (GSSG) é catalisada pela glutathiona redutase (GR, E.C. 1.6.4.2) usando NADPH como agente redutor (GRATÃO et al., 2015; ALVES et al., 2017).

Os cloroplastos são as primeiras organelas a sofrerem danos oxidativos, levando a redução da fotossíntese quando as plantas lidam com o estresse ambiental (KARUPPANAPANDIAN et al., 2011; SHARMA et al., 2012). No entanto, o fornecimento de níveis adequados de Se pode diminuir os danos aos cloroplastos e aumentar os teores de pigmentos fotossintéticos e carotenóides, contribuindo para proteção do sistema fotossintético (FILEK et al., 2010; WANG; WANG; WONG, 2012; ZHANG et al., 2014; FENG et al., 2015). A taxa fotossintética das plantas é reforçada com aplicação de Se em baixas concentrações, estando intimamente relacionada com a diminuição dos níveis de ERO, reativação da atividade antioxidante e restauração da estrutura danificada dos cloroplastos (FENG; WEI; TU, 2013). Contudo, a aplicação de Se em concentrações elevadas pode danificar o aparelho fotossintético e inibir a fotossíntese (WANG; WANG; WONG, 2012), levando ao acúmulo de ERO nas células vegetais.

Nas plantas, o Se é metabolizado pela mesma via de assimilação de enxofre, sendo que sua distribuição e acumulação dependem da fonte química e concentração de Se (WHITE et al., 2004; WHITE, 2016). O Se é absorvido principalmente nas formas de selenato (SeO_4^{2-}), altamente disponível às raízes, selenito (SeO_3^{2-}) e alguns compostos orgânicos em menor proporção (SORS; ELLIS; SALT, 2005). O selenato compete diretamente com o sulfato, uma vez que seu transporte ocorre através do plasmalema por transportadores de sulfato de alta afinidade e permanecem em forma inorgânica (WHITE et al., 2004; WHITE; BROADLEY, 2009). Em contraste, a absorção de selenito envolve transportadores de fosfato, permanecendo em forma orgânica (HOPPER; PARKER, 1999; LI; MCGRATH; ZHAO, 2008).

A couve-flor, por ser uma Brássica considerada acumuladora de Se, converte esse elemento em compostos quimioprotetores capazes de proteger o organismo humano de diversos tipos de doenças (FAIRWEATHER-TAIT et al., 2011). Assim, devido seu consumo amplo no Brasil e no mundo, a inflorescência dessa planta enriquecida em Se pode beneficiar a nutrição e a saúde humana. No entanto, para a eficácia do enriquecimento de Se nas culturas alimentares, com intuito de

biofortificação, a adoção de fontes e concentrações de Se adequadas é fundamental para o sucesso da técnica, evitando efeitos fitotóxicos e redução de produtividade das plantas, fatores que podem ter relação com maquinaria fotossintética e a regulação de sistemas antioxidante de defesa (RAMOS et al., 2010; WANG; WANG; WONG, 2012).

Nesse sentido, considerando que a couve-flor é uma cultura propensa a integrar programas de biofortificação e diante a necessidade de se obter mais informações sobre o efeito do fornecimento de Se em processos fisiológicos e bioquímicos das plantas, realizou-se este estudo com o objetivo de analisar a capacidade fotossintética e de enzimas antioxidantes em plantas de couve-flor biofortificadas com Se.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Localização, instalação e condução do experimento

O experimento em sistema hidropônico foi conduzido em ambiente protegido na Universidade Estadual Paulista, campus de Jaboticabal, São Paulo (21° 15' 22" S, 48° 15' 58" W e 615 m de altitude), entre 23 de janeiro a 30 de abril de 2015. Durante o período de cultivo, registrou-se temperaturas máxima média de 31 °C, mínima média de 19,7 °C e umidade relativa média do ar de 77%.

As mudas de couve-flor, híbrido 'Sharon', foram formadas em espuma fenólica e mantidas em ambiente protegido. Aos 10 dias após a semeadura (DAS), as plântulas foram transferidas para sistema hidropônico NFT (*nutrient film technique*), permanecendo neles até apresentarem quatro folhas totalmente desenvolvidas. Posteriormente, procedeu-se o transplante para canais hidropônicos de policloreto de polivinila (PVC), com 0,20 e 2,0 m de diâmetro e comprimento, respectivamente, cobertos com papel Tetra Pak® para evitar a incidência de luz na solução nutritiva. O espaçamento utilizado foi de 0,50 m entre plantas e 1,0 m entre canais de cultivo, os quais foram instalados com 5% de declividade e ligados a um reservatório com capacidade para 40 L de solução nutritiva, sendo essa bombeada para os canais por meio de bombas submersas.

A solução nutritiva utilizada foi de Hoagland e Arnon (1950) com modificações nas concentrações de N (189 mg L^{-1}), K (211 mg L^{-1}) e Ca (150 mg L^{-1}), sendo preparada com água deionizada. O pH foi monitorado e mantido durante todo o período experimental entre 5,8 e 6,5. A solução foi renovada sempre que a condutividade elétrica atingiu $1,5 \text{ dS m}^{-1}$, correspondente a 70% da inicial.

Os tratamentos utilizados foram fontes químicas de selênio (selenato de sódio – Na_2SeO_4 e selenito de sódio – $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich) e concentrações de Se (0, 5, 15, 30 e $60 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$), organizados em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 2×5 , com quatro repetições e unidade experimental constituída de quatro plantas por canal. As aplicações de Se foram realizadas 15 dias após a transferência das plantas para os canais de PVC e reaplicada por ocasião das renovações da solução nutritiva.

No período de 75 e 90 DAS, correspondente a 35 e 50 dias de exposição ao selênio, respectivamente, amostras de tecido foliar da parte central da primeira folha recém-desenvolvida da couve-flor foram coletadas e imediatamente imersas em nitrogênio líquido e, em seguida, armazenadas em freezer $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ para posterior extração e quantificação de proteínas solúveis totais para análises das enzimas antioxidantes, determinação da peroxidação lipídica e conteúdo de H_2O_2 . No final do experimento, aos 100 DAS, as plantas foram colhidas, acondicionadas em sacos de papel e, posteriormente, secas em estufa de circulação forçada de ar ($65 \text{ }^\circ\text{C}$) até obter massa constante para a determinação da massa seca total e teor de Se.

3.2.2 Características avaliadas

Massa seca total e teor de Se

As plantas de couve-flor, após colhidas, foram lavados em água corrente, mergulhadas em solução de ácido clorídrico (1%) e depois em água deionizada. Posteriormente, as amostras foram secas em estufa ($65 \text{ }^\circ\text{C}$) por 72 horas e pesadas em balança analítica para determinar a massa seca total (em gramas). Em seguida, o material da raiz, caule, folhas e inflorescência foram moídos em moinho de facas e, o pó fino obtido, digerido em HNO_3 em bloco de digestão aquecido gradualmente para

203 °C. Após esse processo, o teor de Se foi determinado, em cada material vegetal, pela técnica de espectrometria de fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDXRF – energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry) descrita por Tezotto et al. (2013).

Trocas gasosas

Em cada unidade experimental, na primeira folha recém-desenvolvida em uma das plantas úteis, aos 75 e 90 DAS, no horário entre as 08:00 e 12:00, foram mensurados a concentração interna de CO₂ (C_i) ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{CO}_2$), taxa de transpiração (E) ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{H}_2\text{O}$), condutância estomática (g_s) ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{H}_2\text{O}$) e taxa de fotossíntese (A) ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1} \text{CO}_2$), utilizando um analisador de gás infravermelho portátil (LC-PRO+, ADC Bioscientific Ltda Herts England) com radiação artificial de $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Peroxidação lipídica e teor de peróxido de hidrogênio

A peroxidação lipídica foi estimada pelo teor de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acordo com métodos descritos por Heath e Packer (1968). A concentração de malondialdeído (MDA) foi determinada pela leitura em espectrofotômetro entre 535 e 600 nm, sendo os dados calculados com base no coeficiente de extinção de $1,55 \times 10^{-5} \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (GRATÃO et al., 2012).

O teor de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi estimado conforme os métodos de Alexieva et al. (2001). O tecido foliar das plantas foram homogeneizados em ácido tiobarbitúrico (0,1%) e centrifugados a 10.000 g durante 10 min. O sobrenadante obtido foi adicionado a 100 mmol L⁻¹ de Tampão fosfato de potássio (pH 7,5) e solução de iodeto de potássio (1 mol L⁻¹), e em seguida incubado em gelo durante uma hora. A leitura foi realizada na absorbância a 390 nm e o teor de H₂O₂ determinado com base em curva padrão de concentração de H₂O₂.

Teor de clorofila e carotenóides

Amostras de tecido foliar da parte central da primeira folha recém-desenvolvida da couve-flor foram coletadas, aos 75 e 90 DAS, e adicionadas em eppendorfs com acetona (80%). Após período de 48 horas sob agitação a 4 °C, as amostras contendo a solução com os pigmentos foram lidas em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda de 470 nm para carotenóides e 662 nm e 645 nm para a clorofila a e b, respectivamente. O teor de cada pigmento foi calculado seguindo a metodologia de Lichtenthaler (1987).

Extração enzimática e determinação de proteínas

Amostras de tecido de folha fresca foram homogeneizadas, usando um pilão em processo refrigerado, em tampão de extração contendo tampão fosfato de potássio 100 mmol L⁻¹ (pH 7,5), 1 mmol L⁻¹ ácido etilenodiamina tetraacetico (EDTA), 3 mmol L⁻¹ DL-ditioneitol e 5% (p/v) polivinil-polipirrolidona (BOARETTO et al., 2014). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g durante 30 min a 4 °C e o sobrenadante armazenado a -80 °C para determinar as atividade enzimáticas de superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona redutase (GR) e ascorbato peroxidase (APX). A concentração de proteína foi determinada seguindo o método de Bradford (1976) utilizando albumina de soro bovino como padrão, sendo expresso em mg ml⁻¹ proteína.

Superóxido Dismutase (SOD, E.C. 1.15.1.1)

A atividade de superóxido dismutase (SOD) foi determinada em espectrofotômetro, conforme descrito em Cembrowska-Lech, Koprowski e Kępczyński (2015), sendo a reação conduzida em uma câmara de reação (caixa) sob iluminação de lâmpada fluorescente de 15 W, a 25 °C. O meio de reação consistiu de tampão fosfato de potássio 50 mmol L⁻¹ (pH 7,8), metionina 50 mmol L⁻¹, NBT 1 mmol L⁻¹ (azul de nitrotetrazólio), EDTA 10 mmol L⁻¹ e riboflavina 0,1 mmol L⁻¹. A leitura foi realizada a 560 nm e a atividade de SOD expressa em U mg⁻¹ proteína.

Catalase (CAT, E.C. 1.11.1.6)

A atividade de catalase (CAT) foi determinada pela mistura de reação de 1 mL de 100 mmol L⁻¹ de tampão fosfato de potássio (pH 7,5) e 2,5 µL H₂O₂ (solução a 30%). A atividade enzimática foi quantificada pelo monitoramento da decomposição do H₂O₂ em espectrofotômetro a 240 nm por 1 minuto conforme descrito por Nogueiro et al. (2015). A atividade de CAT foi expressa em µmol min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

Glutathione Redutase (GR, E.C. 1.6.4.2)

A determinação da glutathione redutase (GR) foi realizada em espectrofotômetro, a 30 °C, a partir da mistura de tampão fosfato de potássio 100 mmol L⁻¹ (pH 7,5) contendo ácido 5,5 ditiobis 1 mmol L⁻¹ (ácido 2-nitrobenzóico), GSSG 1 mmol L⁻¹ e NADPH 0,1 mmol L⁻¹. A atividade da GR foi estimada pela redução da GSSG seguida por monitoramento do aumento da absorvância a 412 nm durante 1 minuto de acordo com Carvalho et al. (2013). A atividade de GR foi expressa em µmol min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

Ascorbato Peroxidase (APX, E.C. 1.11.1.11)

A atividade de ascorbato peroxidase (APX) foi mensurada em reação contendo o extrato vegetal, tampão fosfato de potássio 80 mmol L⁻¹ (pH 7,0), ascorbato 5 mmol L⁻¹, EDTA 1 mmol L⁻¹ e H₂O₂ 1 mmol L⁻¹ (GRATÃO et al., 2012). A leitura foi realizada em espectrofotômetro monitorando, ao longo de 1 minuto, a taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm a 30 °C. A atividade de APX foi expressa em µmol min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

3.2.3 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F ($\alpha \leq 5\%$). As concentrações de Se foram analisadas em estudos de regressão, em que optou-se pela equação significativa e com maior coeficiente de determinação. Para realização das análises foi utilizado o software estatístico *AgroEstat* (BARBOSA; MALDONATO JÚNIOR, 2015).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Massa seca total e teor de Se

O Se fornecido nas fontes selenato e selenito, ao longo dos 50 dias de aplicação, reduziu a massa seca total das plantas de couve-flor a partir da concentração de 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Se (Figura 1A e 1B). A concentração de 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Se, na fonte selenato, promoveu maiores incrementos na massa seca das plantas, o que refletiu em aumento de 22% na massa seca total das plantas (Figura 1A). Os resultados de massa seca encontrados com selenito foram inferiores aos obtidos com selenato (Figura 1B). Contudo, maiores massas secas foram obtidas em concentrações até 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Se.

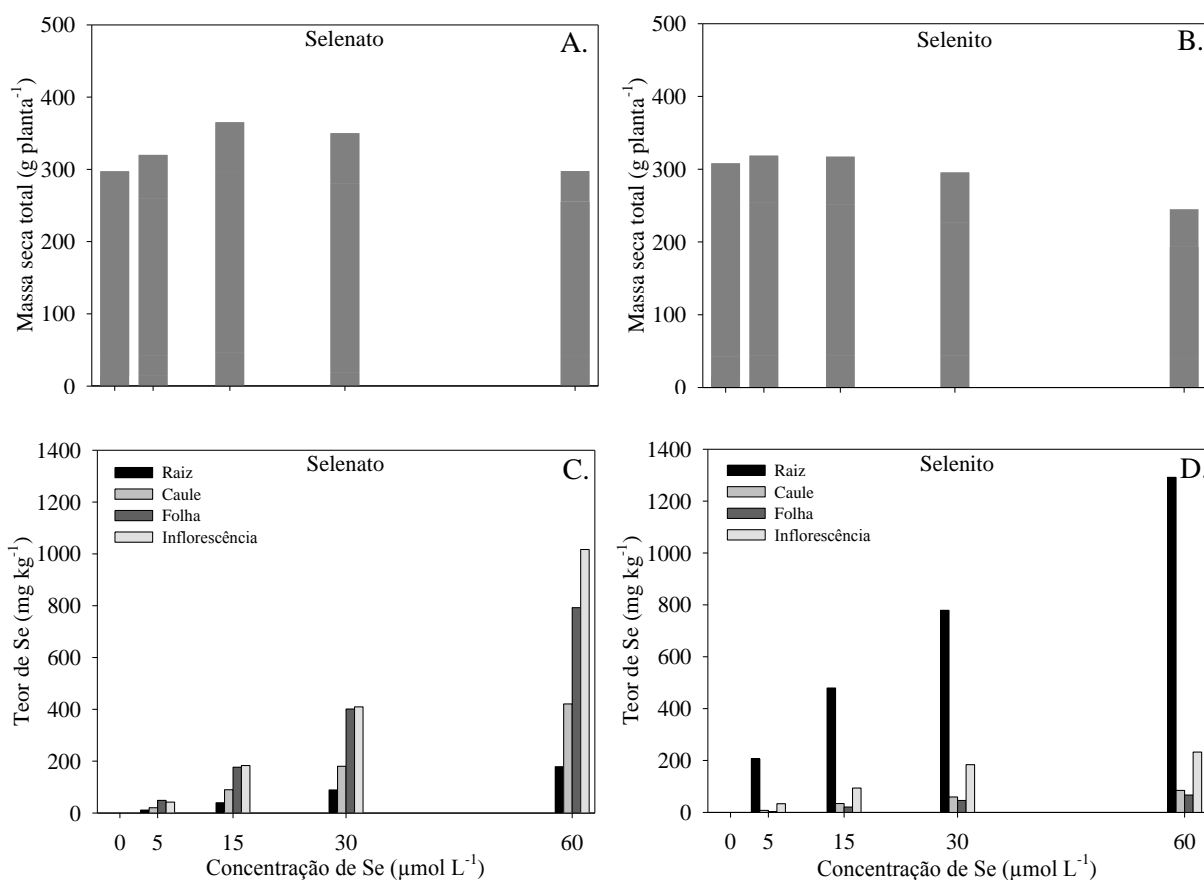


Figura 1. Efeito das concentrações de Se na massa seca total da couve-flor na fonte selenato (A) e selenito (B) e teor de selênio nas partes da couve-flor na fonte selenato (C) e selenito (D).

O aumento na concentração de Se, em ambas as fontes, incrementou o teor de Se nas partes da couve-flor. Quando se aplicou selenato, independente da concentração, os maiores teores de Se foram encontrados nos tecidos da inflorescência, em seguida na folha, no caule e na raiz das plantas (Figura 1C). Com aplicação de selenito, a raiz concentrou-se os maiores teores de Se, os quais foram cinco vezes maior que os encontrados na inflorescência (Figura 1D). Já os menores teores foram observados na folha das plantas.

3.3.2 Análise de trocas gasosas

A concentração interna de CO₂ (C_i), analisada aos 75 DAS, diferiu entre as concentrações e fontes de Se (Tabela 1). O aumento da concentração de Se até 30 μmol L⁻¹, na fonte selenato, reduziu a C_i (Figura 2A). Entretanto, em concentrações superiores a esta houve aumento de C_i, verificando-se na maior concentração de Se (60 μmol L⁻¹) resultados similares aos obtidos no tratamento controle (0 μmol L⁻¹). Com selenito, a variação da concentração de Se resultou em C_i próximo aos obtidos no controle, porém, superiores aos encontrados com selenato (Figura 2A). Aos 90 DAS, não houve efeito das fontes e concentrações de Se na C_i (Tabela 1).

As fontes e concentrações de Se não influenciaram a taxa de transpiração (E) das plantas de couve-flor, quando avaliadas aos 75 e 90 DAS (Tabela 1). Todavia, as maiores taxas de transpiração foram encontradas aos 90 DAS, sendo cerca do dobro da observada aos 75 DAS.

Tabela 1. Resumo da análise de variância para concentração interna de CO₂ (Ci), taxa de transpiração (E), condutância estomática (gs) e taxa de fotossíntese (A) em folhas de couve-flor aos 75 e 90 dias após semeadura (DAS) em função de fontes (● selenato; ○ selenito) e concentrações de Se.

Causa da Variação	Ci - 75 DAS	Ci - 90 DAS	E - 75 DAS	E - 90 DAS	gs - 75 DAS	gs - 90 DAS	A - 75 DAS	A - 90 DAS
Fontes Se (F)	8,51 ^{**1}	0,91 ^{ns}	2,53 ^{ns}	0,32 ^{ns}	5,12 [*]	0,00 ^{ns}	2,29 ^{ns}	4,22 [*]
Concentração Se (C)	7,20 ^{**}	1,50 ^{ns}	1,41 ^{ns}	0,21 ^{ns}	3,83 [*]	1,67 ^{ns}	4,32 ^{**}	6,94 ^{**}
F x C	0,73 ^{ns}	0,14 ^{ns}	0,72 ^{ns}	0,06 ^{ns}	0,35 ^{ns}	0,02 ^{ns}	3,45 [*]	0,69 ^{ns}
CV (%)	10,6	8,7	9,7	5,8	15,3	22,6	7,0	9,1

Fontes de Se	Média							
Selenato	208,85 b	223,9 a	5,72 a	11,93 a	0,417 b	0,420 a	19,22 a	19,43 a
Selenito	230,45 a	229,8 a	6,01 a	11,80 a	0,465 a	0,421 a	19,87 a	18,31 b
DMS	15,1	12,7	0,38	0,44	0,043	0,06	0,88	1,1

Concentrações Se	Média							
0 µmol L ⁻¹	237,0	238,9	5,90	11,69	0,480	0,482	18,63	16,31
5 µmol L ⁻¹	212,5	231,3	5,75	11,86	0,424	0,436	20,72	18,42
15 µmol L ⁻¹	199,0	224,8	5,65	11,99	0,407	0,385	20,34	19,33
30 µmol L ⁻¹	201,0	216,7	5,76	11,94	0,394	0,374	19,61	19,97
60 µmol L ⁻¹	248,7	223,0	6,25	11,85	0,501	0,425	18,44	20,33

¹ Teste F, **: p ≤ 0,01; *: p ≤ 0,05; ns: não significativo; CV: coeficiente de variação; DMS: diferença mínima significativa

Os fatores fontes e concentrações de Se influenciaram a condutância estomática (*gs*) apenas aos 75 DAS (Tabela 1). O aumento da concentração de Se, em selenato e selenito, diminuiu a *gs* nas folhas de couve-flor na primeira época (75 DAS) (Figura 2B). Os menores valores de *gs* foram constatadas com 31 e 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Se na fonte selenato e selenito, respectivamente, embora com selenato os resultados foram inferiores aos constatados com selenito.

A taxa de fotossíntese (*A*) analisada aos 75 DAS foi influenciada pela interação entre fontes e concentrações de Se (Tabela 1). Nessa época, o Se fornecido em baixas concentrações, na fonte selenato, aumentou a taxa de *A* nas plantas, sendo 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Se a concentração que proporcionou maior incremento de *A* (Figura 2C). Nas plantas tratadas com elevadas concentrações de Se, a taxa de *A* foi reduzida, verificando-se máxima redução em 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Se. A taxa de fotossíntese das plantas expostas à selenito não diferiu com o aumento das concentrações de Se na solução nutritiva (Figura 2C). Aos 90 DAS, a fonte e concentração de Se afetou a taxa de *A* (Tabela 1). Os resultados obtidos, aos 90 DAS, com selenato e selenito, apresentaram tendências diferentes das observadas aos 75 DAS. Em ambas as fontes, houve incremento de *A* ao variar a concentração de 0 a 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Se (Figura 2D). No entanto, com selenito, independente da concentração de Se, os valores de *A* foram menores que os constatados com selenato.

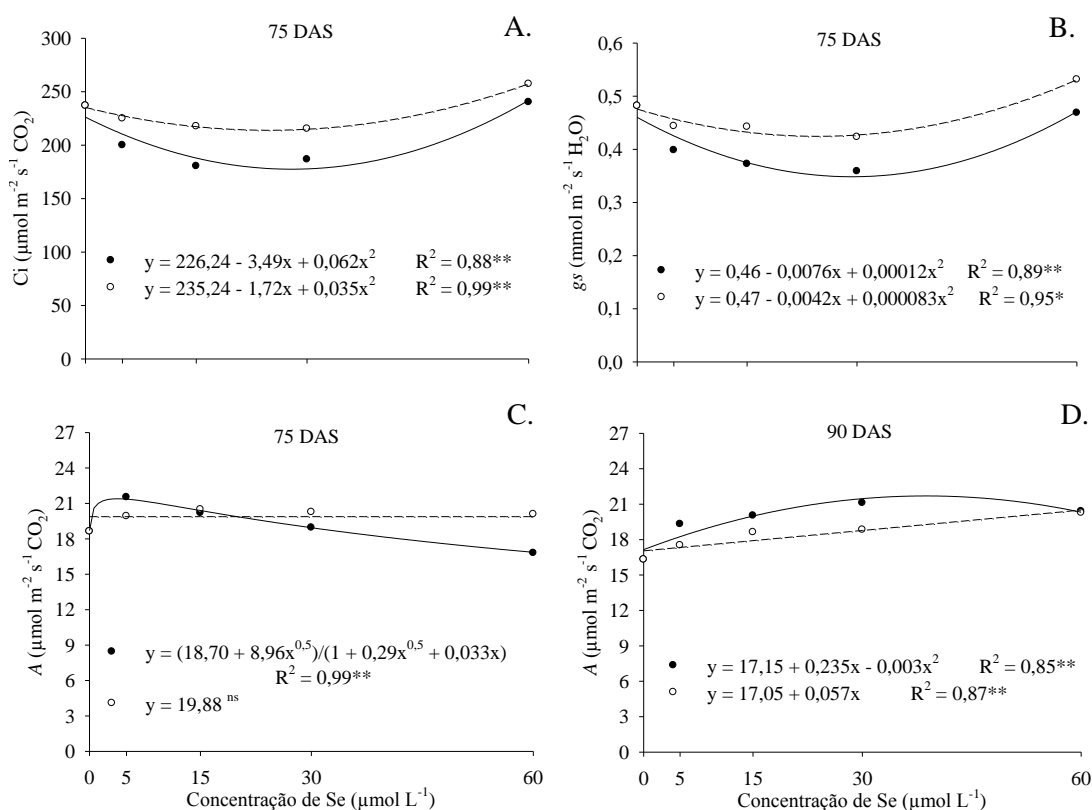


Figura 2. Quantificação da concentração interna de CO_2 (Ci) e condutância estomática (gs) aos 75 DAS e taxa de fotossíntese (A) aos 75 e 90 DAS em folhas de couve-flor em função de fontes (\bullet selenato; \circ selenito) e concentrações de Se.

3.3.3 Peroxidação lipídica e teor de H_2O_2

A fonte e concentração de Se influenciou o teor de malondialdeído (MDA) analisado aos 75 DAS (Tabela 2). Nessa época, o fornecimento de selenito promoveu teores de MDA em folhas de couve-flor maiores que os resultados obtidos com selenato (Figura 3A). As concentrações crescentes de Se, em ambas as fontes, incrementaram linearmente o teor de MDA, sendo obtido, com $60 \mu\text{mol L}^{-1}$, teores máximos de 3 nmol g^{-1} , na fonte selenato, e 4 nmol g^{-1} , com selenito. Na segunda época (90 DAS), houve interação entre os fatores de estudo, mas não foi evidenciado diferença significativa entre as fontes de Se (Tabela 2). As plantas tratadas com selenato, até concentração de $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ Se, apresentaram maior teor de MDA em

relação as que receberam selenito (Figura 3B). Maiores resultados foram encontrados na aplicação de 30 e 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Se, na fonte selenato e selenito, respectivamente.

O teor de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) no tecido foliar não variou com a aplicação das concentrações de Se nas duas épocas de avaliação (Tabela 1). Entretanto, observou-se teores de H_2O_2 mais pronunciados em plantas que receberam selenito, sendo os resultados encontrados aos 75 DAS maiores que os obtidos na segunda época (90 DAS).

No tecido da inflorescência, os teores de MDA e H_2O_2 foram influenciados pelas concentrações de Se, sendo efeito das fontes observado apenas na variável H_2O_2 (Tabela 2). Maiores valores de MDA e H_2O_2 foram obtidos com aplicação de selenato, incrementando-se na medida em que houve aumento da concentração de Se na solução nutritiva (Figura 3C e 3D). Nesta fonte, os teores máximos de MDA e H_2O_2 foram encontrados com 44 e 31 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Se, respectivamente. Com selenito, o H_2O_2 foi reduzido com aumento das concentrações de Se (Figura 3D).

Tabela 2. Resumo da análise de variância para teor de malondialdeído (MDA) e de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em folhas aos 75 e 90 DAS e na inflorescência da couve-flor (INF), teor de clorofila total (CloT) e carotenóides (Car) em folhas de couve-flor aos 75 e 90 DAS em função de fontes (● selenato; ○ selenito) e concentrações de Se.

Causa da Variação	MDA	MDA	MDA-INF	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ -INF	CloT	CloT	Car	Car
	75 DAS	90 DAS		75 DAS	90 DAS		75 DAS	90 DAS	75 DAS	90 DAS
Fontes Se (F)	16,55** ¹	2,52 ^{ns}	2,13 ^{ns}	7,25*	0,22 ^{ns}	11,38**	10,28**	0,83 ^{ns}	0,23 ^{ns}	2,78 ^{ns}
Concentração Se (C)	13,87**	13,87**	2,84*	1,12 ^{ns}	0,27 ^{ns}	3,21*	18,42**	22,32**	6,62**	10,59**
F x C	0,71 ^{ns}	13,64**	1,03 ^{ns}	1,12 ^{ns}	1,11 ^{ns}	1,12 ^{ns}	6,90**	1,10 ^{ns}	2,82*	0,77 ^{ns}
CV (%)	15,8	11,0	14,5	15,7	22,8	19,7	4,4	6,4	7,0	35,7
Fontes de Se										
	Média									
Selenato	2,59 b	2,44 a	3,96 a	342,05 b	301,85 a	134,51 a	59,44 a	69,21 a	8,03 a	1,71 a
Selenito	3,19 a	2,31 a	3,70 a	391,15 a	312,32 a	108,84 b	56,84 b	70,94 a	7,94 a	1,41 a
DMS	0,29	0,17	0,36	37,2	45,2	15,5	1,6	2,90	0,36	0,36
Concentrações Se										
	Média									
0 µmol L ⁻¹	2,52	1,98	3,47	377,25	323,14	119,87	53,05	63,84	7,28	1,05
5 µmol L ⁻¹	2,49	2,13	3,49	329,13	292,55	130,12	58,74	64,93	7,91	1,27
15 µmol L ⁻¹	2,80	2,34	3,95	380,10	317,62	133,88	60,98	66,26	8,30	1,40
30 µmol L ⁻¹	3,11	2,59	4,16	367,12	298,02	128,51	62,51	72,31	8,62	1,86
60 µmol L ⁻¹	3,54	2,84	4,09	379,43	304,12	95,98	55,44	81,95	7,83	2,53

¹ Teste F, **: p ≤ 0,01; *: p ≤ 0,05; ns: não significativo; CV: coeficiente de variação; DMS: diferença mínima significativa

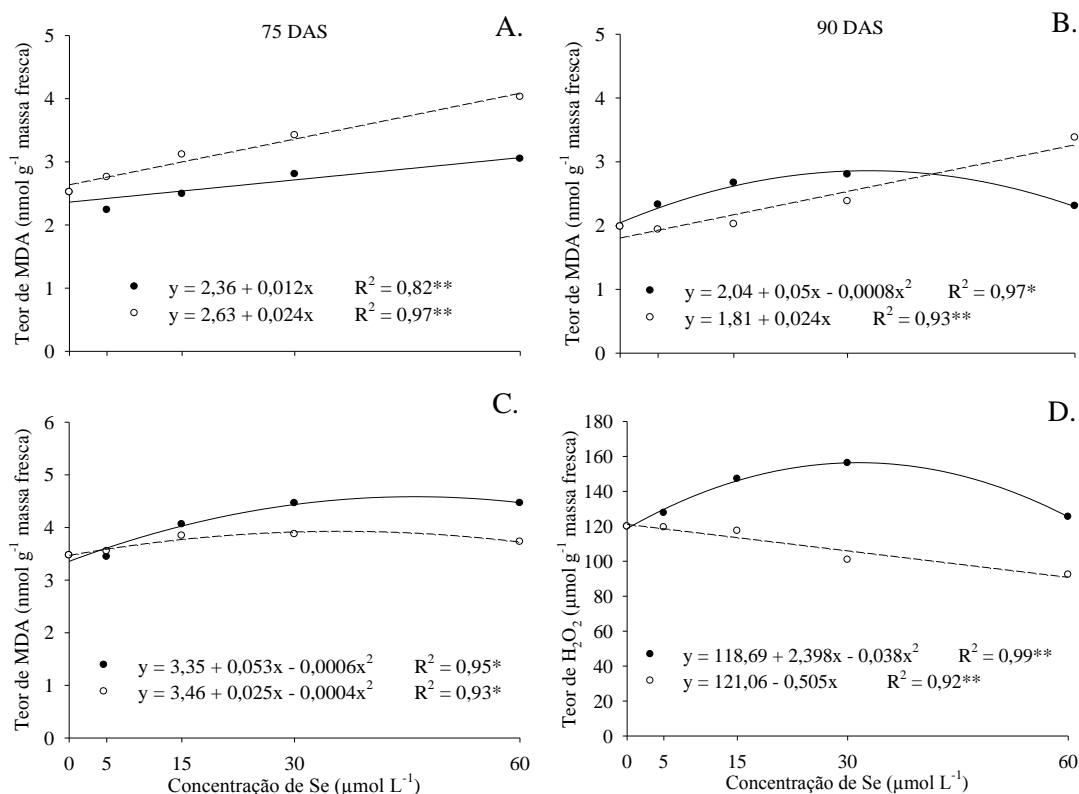


Figura 3. Peroxidação lipídica pela quantificação do teor de malondialdeído (MDA) nas folhas aos 75 DAS (A) e 90 DAS (B) e na inflorescência da couve-flor (C) e teor de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) mensurado na inflorescência de plantas de couve-flor (D) em função de fontes (● selenato; ○ selenito) e concentrações de Se.

3.3.4 Teor de clorofila e carotenóides

O teor de clorofila total (CloT) e carotenoides (Car), analisados aos 75 DAS, foi afetado pela interação entre fontes e concentrações de Se (Tabela 2), apresentando diferença entre as fontes de Se, sendo os maiores resultados encontrados com aplicação de selenato. Aumento no teor de clorofila ocorreu com o incremento da concentração de Se até $37 \mu\text{mol L}^{-1}$, na fonte selenato, e $25 \mu\text{mol L}^{-1}$, em selenito (Figura 4A). A partir dessas concentrações, houve redução no teor de clorofila, sendo mais expressiva em plantas tratadas com selenito. Na avaliação aos 90 DAS, o teor de clorofila e carotenoides não diferiram entre as fontes de Se, mas diferiu com o

fornecimento das concentrações de Se (Tabela 2), ocorrendo aumento com a aplicação crescente de Se na solução nutritiva, com maiores teores na concentração de $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ Se (Figura 4B).

As fontes de Se apresentaram diferença no teor de carotenóides, apenas quando se aplicou $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ Se, com maiores resultados constatados em selenato (Figura 4C e 4D). O aumento das concentrações de Se incrementaram o teor desse pigmento nas plantas analisadas aos 75 e 90 DAS. No entanto, verificou-se que os teores encontrados aos 90 DAS foram menores que os obtidos na primeira época (75 DAS).

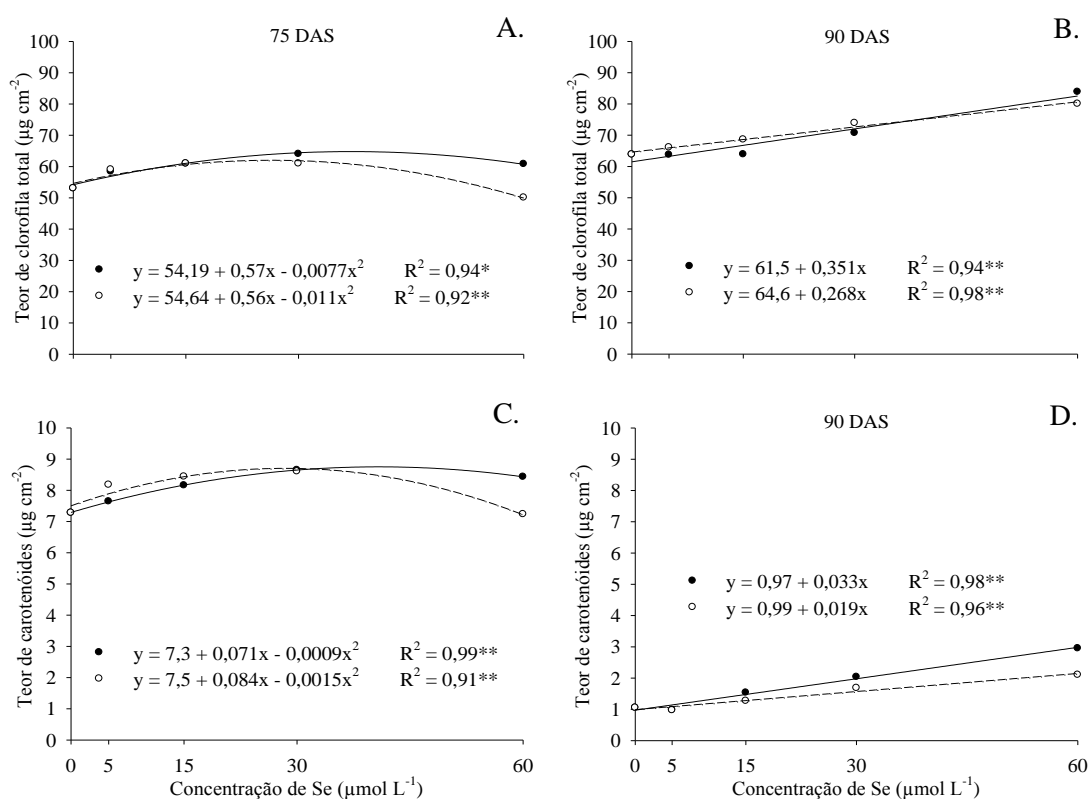


Figura 4. Teor de clorofila total e carotenóides em folhas de couve-flor aos 75 e 90 DAS em função de fontes (● selenato; ○ selenito) e concentrações de Se.

3.3.5 Atividade de enzimas antioxidantes

Na primeira época, 75 DAS, a atividade de SOD em folhas de couve-flor foi influenciada apenas pelas fontes de Se (Tabela 3), embora tenha sido reduzida com o aumento da concentração de Se em ambas as fontes, selenato e selenito (Figura

5A). No entanto, maiores reduções da SOD foram encontradas com fornecimento de selenito às plantas. Estes resultados foram diferentes dos observados aos 90 DAS, em que o selenito induziu aumento na atividade de SOD comparado ao selenato (Figura 5B). As plantas tratadas com selenito, na concentração de $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ Se, tiveram incremento na atuação da SOD em 40% quando comparada a atividade dessa enzima nas plantas controle ($0 \mu\text{mol L}^{-1}$ Se).

As enzimas CAT e GR atuam fundamentalmente na desintoxicação de qualquer excesso de H_2O_2 produzido pela atividade da SOD e/ou outros processos metabólitos. A atividade dessas enzimas foram afetadas pela interação dos fatores fontes e concentrações de Se em ambas as épocas de avaliação, 75 e 90 DAS (Tabela 3). Nas folhas de couve-flor, aos 75 DAS, a atividade de CAT (Figura 5C) e GR (Figura 5E) foram intensificadas após aplicação de selenato e aumento das concentrações de Se na solução nutritiva. Enquanto com selenito, a atividade da CAT permaneceu inalterada e a atuação da GR reduziu com o aumento das concentrações de Se. Na segunda época, 90 DAS, as plantas tratadas com selenito, até a concentração de $35 \mu\text{mol L}^{-1}$ Se, exibiram aumento na atividade de CAT (Figura 5D) e GR (Figura 5F), com resultados superiores aos observados com a fonte selenato.

A APX também atua na eliminação de H_2O_2 em excesso na célula. Sua atividade, nas duas épocas de avaliação, 75 e 90 DAS, foi afetada apenas pelas concentrações de Se (Tabela 3). As plantas quando receberam Se em concentrações crescentes até $26 \mu\text{mol L}^{-1}$ Se (Figura 5G) e $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ Se (Figura 5H) exibiram aumento na atividade de APX. Os resultados encontrados aos 90 DAS entre as concentrações de 0 a $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ Se foram menores que os obtidos nas mesmas concentrações aos 75 DAS.

Tabela 3. Resumo da análise de variância para as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona redutase (GR) e ascorbato peroxidase (APX) em folhas de couve-flor aos 75 e 90 DAS e na inflorescência (INF) de couve-flor em função de fontes (● selenato; ○ selenito) e concentrações de Se.

Causa da Variação	SOD	SOD	SOD-INF	CAT	CAT	GR	GR	GR-INF	APX	APX	APX-INF
	75 DAS	90 DAS		75 DAS	90 DAS	75 DAS	90 DAS		75 DAS	90 DAS	
Fontes Se (F)	4,85* ¹	13,52*	5,15*	4,49*	8,16**	11,75**	3,70 ^{ns}	1,51 ^{ns}	0,95 ^{ns}	0,02 ^{ns}	0,69 ^{ns}
Concentração Se (C)	2,59 ^{ns}	2,67 ^{ns}	15,15**	2,87*	3,13*	0,56 ^{ns}	0,99 ^{ns}	2,69 ^{ns}	2,77*	11,26**	1,93 ^{ns}
F x C	0,35 ^{ns}	1,56 ^{ns}	0,49 ^{ns}	3,32*	1,75 ^{ns}	3,21*	6,06**	2,52 ^{ns}	0,47 ^{ns}	0,90 ^{ns}	1,09 ^{ns}
CV (%)	15,9	15,3	10,3	12,4	18,1	14,2	18,5	13,0	12,9	24,4	11,4
Fontes de Se						Média					
Selenato	8,24 b	7,27 b	11,36 a	24,88 a	22,23 b	1,37 a	0,98 a	1,55 a	519,1 a	381,9 a	1821,7 a
Selenito	7,38 a	8,69 a	10,54 b	22,89 b	26,20 a	1,18 b	1,09 a	1,47 a	498,8 a	385,9 a	1767,6 a
DMS	0,80	0,79	0,73	1,91	2,84	0,12	0,12	0,12	42,5	60,6	132,83
Concentrações Se						Média					
0 µmol L ⁻¹	8,63	7,08	12,62	21,54	21,04	1,22	1,09	1,55	479,5	305,9	1731,3
5 µmol L ⁻¹	8,29	7,70	12,10	24,57	21,67	1,24	1,04	1,33	527,0	266,4	1878,3
15 µmol L ⁻¹	7,73	8,75	11,40	25,10	24,98	1,26	1,11	1,64	535,5	359,2	1826,0
30 µmol L ⁻¹	7,60	8,64	9,35	25,70	27,39	1,33	0,94	1,49	546,1	444,8	1651,7
60 µmol L ⁻¹	6,80	7,71	9,27	22,53	26,97	1,32	1,01	1,56	456,8	543,1	1886,2

¹ Teste F, **: p ≤ 0,01; *: p ≤ 0,05; ns: não significativo; CV: coeficiente de variação; DMS: diferença mínima significativa

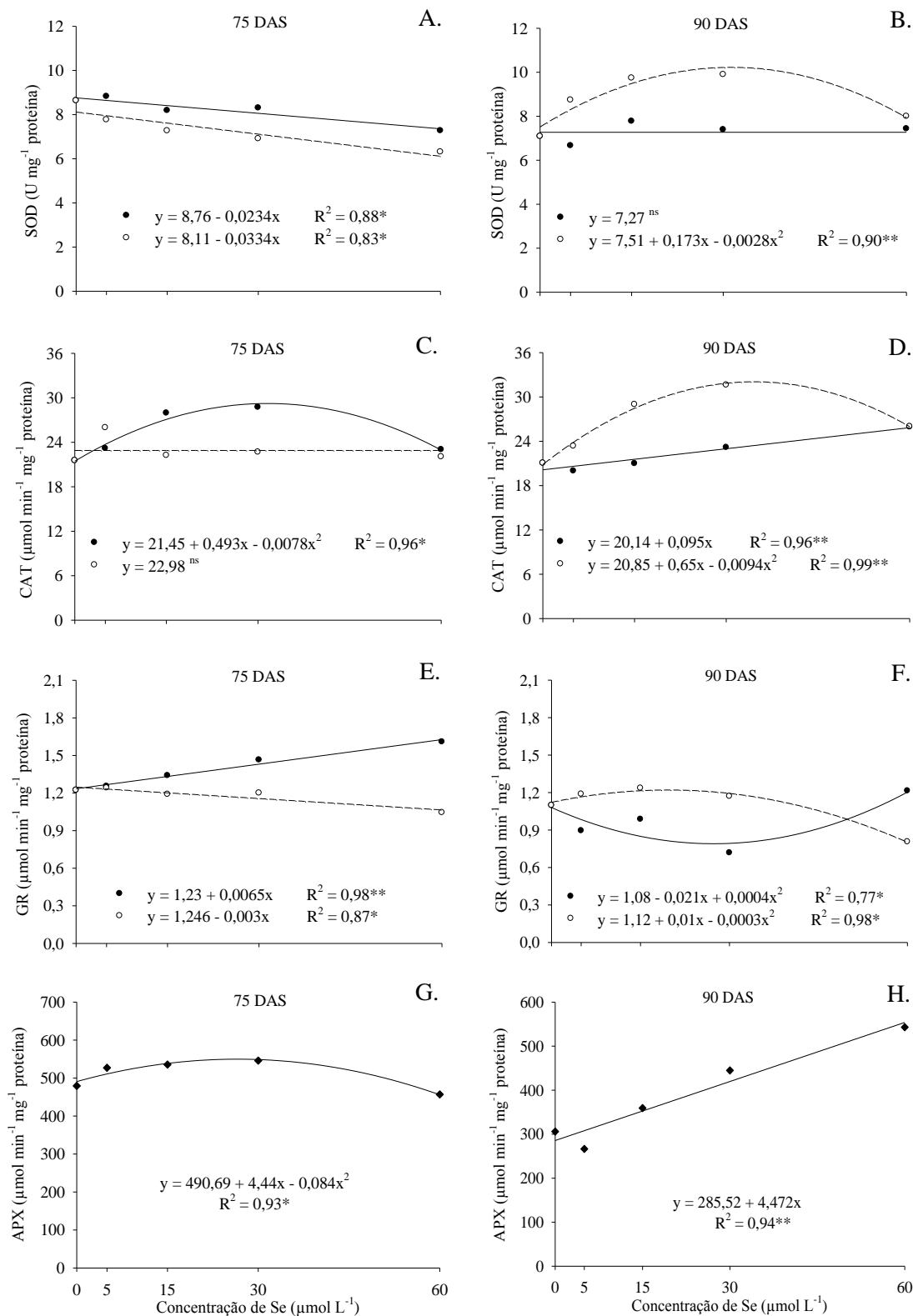


Figura 5. Atividade específica das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona redutase (GR) e ascorbato peroxidase (APX) em folhas de couve-flor aos 75 e 90 DAS em função de fontes (● selenato; ○ selenito) e concentrações de Se. ◆ Média entre as fontes de Se.

No tecido da inflorescência da couve-flor, apenas a atividade enzimática de SOD foi influenciada significativamente pela aplicação das fontes e concentrações de Se (Tabela 3). O aumento da concentração de Se reduziu a atividade de SOD, tanto com selenato como no selenito, embora as menores atividades dessa enzima tenham sido encontradas nas plantas tratadas com selenito (Figura 6).

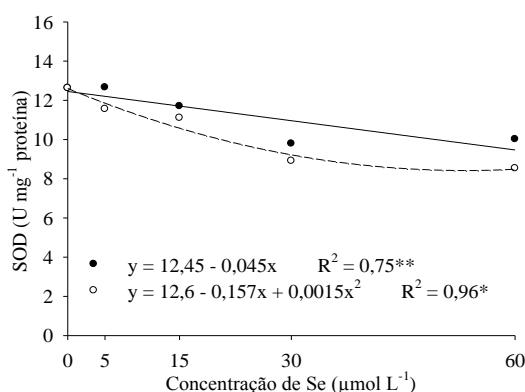


Figura 6. Atividade da superóxido dismutase (SOD) na inflorescência de plantas de couve-flor em função de fontes (● selenato; ○ selenito) e concentrações de Se.

3.4 DISCUSSÃO

O Se têm estimulado o crescimento de diferentes espécies de plantas, o que frequentemente está associado ao aumento da eficiência fotossintética (WANG; WANG; WONG, 2012; FENG et al., 2015). A aplicação de Se em baixas concentrações, na fonte selenato e selenito, promoveu o acúmulo de biomassa em plantas de couve-flor. Em contraste, concentrações elevadas ($\geq 30 \mu\text{mol L}^{-1}$ Se) inibiram o crescimento e, conseqüentemente, reduziu a massa seca das plantas (Figura 1). Estes resultados indicaram duplo efeito do Se nas plantas de couve-flor, com efeito estimulante no crescimento em baixas concentrações, mas em altas concentrações pode ser tóxico para o crescimento e desenvolvimento das plantas (HAWRYLAK-NOWAK, 2013; GUERRERO et al., 2014; JIANG et al., 2015).

Entre as fontes de Se, o selenito pode ter causado maior fitotoxicidade às plantas, uma vez que o acúmulo de biomassa nas plantas de couve-flor tratadas com esta fonte foi menor que o constatado com selenato. O efeito tóxico do Se ocorre pela interferência desse elemento no metabolismo do enxofre e a substituição de aminoácidos sulfurados pelos seus análogos de Se (WHITE et al., 2004). Assim, o selenito por ser rapidamente incorporado em compostos orgânicos ainda nas raízes, causa toxicidade mais rapidamente comparado ao selenato que é incorporado em moléculas orgânicas apenas depois de translocado para as folhas (WHITE et al., 2004; LI; MCGRATH; ZHAO, 2008). O selenato é facilmente translocado para a parte aérea das plantas, o que justifica os elevados teores de Se observados na folha e inflorescência da couve-flor (Figura 1C). Por outro lado, com selenito os maiores teores de Se foram observados na raiz (Figura 1D). Esta fonte por estar em uma forma química mais reduzida é retida nos tecidos da raiz, onde é rapidamente assimilada em compostos orgânicos e translocada para parte aérea das plantas via floema (SORS; ELLIS; SALT, 2005; LI; MCGRATH; ZHAO, 2008). Fato que justifica os baixos teores de Se no caule, folha e inflorescência da couve-flor (Figura 1D).

No presente estudo, a aplicação de Se em baixas concentrações ($\leq 5 \mu\text{mol L}^{-1}$) induziu aumento na taxa de fotossíntese (A) das plantas de couve-flor, apesar de ter reduzido a concentração interna de CO_2 (C_i) e condutância estomática (g_s), sendo as alterações mais perceptíveis com selenato (Figura 2). Isso ocorreu devido provavelmente a menor peroxidação lipídica e menor acúmulo de H_2O_2 observados nas plantas (Figura 3A), sugerindo que o Se, na forma de selenato, contribui para regularidade do transporte de elétrons durante o processo fotossintético, evitando o acúmulo de ERO e, assim, protegendo a funcionalidade e integridade dos cloroplastos, podendo influenciar no aumento da fotossíntese e, conseqüentemente, no crescimento da planta (DIAO et al., 2014; ZHANG et al., 2014; JIANG et al., 2017).

A inibição de A , com aplicação de elevadas concentrações de Se, na fonte selenato (Figura 2C), pode ter relação com o aumento dos níveis de MDA (Figura 3A), indicando dano oxidativo (JIANG et al., 2015). Além disso, estes resultados podem, ainda, ser explicados pela limitação na abertura estomática, uma vez que as folhas de couve-flor apresentaram valores de g_s inferiores aos encontrados no controle, o que

contribuiu para redução no acúmulo de biomassa. Assim, verificou-se que *Ci* e *gs* estão intimamente associadas com a taxa de fotossíntese (ZHANG et al., 2014).

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são produtos do metabolismo celular das plantas e quando acumuladas em excesso podem induzir à peroxidação lipídica da membrana, aumentando, assim, o teor de MDA (HAWRYLAK-NOWAK, 2013; JIANG et al., 2017). Neste estudo, os níveis mais elevados de MDA e H₂O₂ foram observados, aos 75 DAS, em folhas de couve-flor tratadas com selenito, o que sugere maior dano oxidativo na membrana celular (Tabela 2), estando associado, provavelmente, com o menor acúmulo de biomassa nas plantas. Entretanto, no período próximo à colheita da inflorescência, aos 90 DAS, o dano causado por excesso de ERO foi minimizado com aplicação de selenito, sendo obtido menores teores de MDA e H₂O₂ com baixas concentrações de Se (Figuras 3B). Fato associado com o aumento na atividade antioxidante das enzimas SOD, CAT e APX, as quais atuam na eliminação dos radicais livres superóxido e H₂O₂ (Figuras 5B, 5D e 5H).

O selenato reduziu os danos causados por estresse oxidativo nas plantas, promovendo menores teores de MDA em relação ao controle (Figuras 3A). Nesta fonte, baixas concentrações de Se ($\leq 15 \mu\text{mol L}^{-1}$) evitaram o acúmulo de ERO, com redução na peroxidação lipídica, o que contribuiu, provavelmente, para o aumento da fotossíntese e, conseqüentemente, maior acúmulo de biomassa nas plantas de couve-flor. Embora o teor de MDA tenha aumentado em concentrações elevadas de Se, os danos por peroxidação lipídica foram leves quando comparado ao selenito que promoveu maiores teores de MDA e H₂O₂ e redução no crescimento das plantas. Estes resultados confirmam o papel do Se na manutenção da estrutura e integridade da membrana celular quando fornecido em baixas concentrações às plantas (DIAO et al., 2014; JIANG et al., 2015, 2017).

No tecido da inflorescência, a peroxidação lipídica e o teor de H₂O₂ foi maior com selenato (Figuras 3C e 3D). Resultado que pode ter relação com os elevados teores de Se na inflorescência, obtidos com essa fonte, e a baixa atividade da enzima SOD (Figura 6), em que o incremento da concentração de Se, em ambas as fontes, reduziu sua atividade.

Os teores de clorofila e carotenóides não foram alterados pelas fontes de Se, exceto em altas concentrações de Se que causou diminuição nos teores desses

pigmentos com selenito (Figura 4). Geralmente, em altas concentrações de Se o teor de clorofila e carotenóides são afetados negativamente (SUN et al., 2014; JIANG et al., 2015, 2017), o que pode ser, parcialmente, devido à peroxidação lipídica das membranas do cloroplasto, revelado pelo maior teor de MDA (Figura 3A e 3B). No presente estudo, o aumento no teor de clorofila com baixas concentrações de Se pode ser atribuído a eliminação de ERO por enzimas antioxidantes, como SOD, CAT e APX, ou do contrário os danos causados por ERO destruiria os pigmentos de clorofila (SUN et al., 2014). Os carotenóides, antioxidantes não enzimáticos, desempenham papel importante na célula, sendo a primeira linha de defesa contra o dano oxidativo durante a fotossíntese (MAGER; DE KRUIJFF, 1995), e, por isso, são capazes de proteger a membrana fotossintética da foto-oxidação, eliminando ERO, como o oxigênio singlete, e extinguindo o estado triplete da clorofila (DEMMIG-ADAMS, 1990). Nesse sentido, o aumento no teor de carotenóides no tecido foliar das plantas pode estar relacionado com o mecanismo antioxidante.

O estresse oxidativo, produção excessiva de ERO, é prevenido pela ação de enzimas antioxidantes, como SOD, CAT e APX (DIAO et al., 2014; JIANG et al., 2017). Neste estudo, a atividade dessas enzimas aumentou e o nível de peroxidação lipídica e H_2O_2 diminuiu nas folhas de couve-flor tratadas com baixas concentrações de Se ($\leq 15 \mu\text{mol L}^{-1}$) (Figura 3 e 5), o que contribuiu para maior taxa de fotossíntese e acúmulo de biomassa. Esse efeito positivo do Se em baixas concentrações na atividade de enzimas antioxidantes também foi relatado por Ramos et al. (2010) e Sun et al. (2014).

A atividade de SOD diminuiu com a aplicação de Se, principalmente com a fonte selenito, o que pode estar associado a um possível efeito tóxico do Se (Figura 5A). É possível que este resultado tenha relação com a atividade da enzima glutathione peroxidase (GPX, E.C. 1.11.1.9), que é ativada e estimulada pelo Se (FENG; WEI; TU, 2013), podendo eliminar H_2O_2 e hidroperóxidos lipídicos, o que pode resultar em redução na formação do ânion-radical superóxido por meio da inter-transformação dinâmica entre espécies de oxigênio (SUN et al., 2014). Ou seja, o Se aumenta a atividade da GPX na eliminação de H_2O_2 , enquanto ocorre reações de desproporção espontânea de radicais de superóxido, produzindo H_2O_2 e oxigênio singlete, o que, conseqüentemente, reduz a necessidade de atuação da enzima SOD (Figura 5A) e aumenta de CAT e APX para converter H_2O_2 em H_2O (Figuras 5C e 5G).

As enzimas antioxidantes foram afetadas pelas fontes de Se, apresentando distinção quanto a época de avaliação. No período inicial de formação da inflorescência, 75 DAS, o selenato estimulou a atividade de SOD, CAT e GR (Figura 5), indicando que esta fonte de Se é mais efetiva em aliviar o estresse oxidativo pela atividade das enzimas. Evidência sustentada pelos baixos teores de MDA e H₂O₂ obtidos com selenato (Figuras 3A e 3C), que contribuíram para o aumento no crescimento das plantas. Ressalta-se que, com fornecimento de selenato, grande parte do Se absorvido foi acumulado na parte aérea das plantas, região em que está presente a maior proporção das organelas de atuação das enzimas antioxidantes.

O selenito induziu a atividade de SOD e CAT mais tardiamente comparado ao selenato. No período de 90 DAS, a atividade dessas enzimas foram incrementadas com aplicação de selenito (Figuras 5B e 5D), porém não ocorreu redução na peroxidação lipídica (Figura 3B). Embora a atividade enzimática tenha aumentado com selenito, ela não refletiu de forma efetiva para o crescimento das plantas, haja vista que a melhora na atuação das enzimas se incidiu no período de diminuição do metabolismo celular da planta, que corresponde ao final de ciclo da cultura.

3.5 CONCLUSÕES

A suplementação de Se, em baixas concentrações ($\leq 5 \mu\text{mol L}^{-1}$) e na fonte selenato, incrementa o teor de Se na inflorescência da couve-flor, aumenta o acúmulo de biomassa nas plantas e melhora a regulação dos processos fisiológicos e enzimáticos.

O Se contribuiu para extinção do excesso de ERO produzido no metabolismo celular, aperfeiçoando o sistema enzimático e mantendo equilibrado o estado redox na célula, tornando mais efetiva a proteção contra danos oxidativos.

O fornecimento de Se às plantas em elevadas concentrações prejudica o mecanismo de proteção antioxidante e intensifica o dano causado por ERO.

3.6 REFERÊNCIAS

- ALEXIEVA, V.; SERGIEV, I.; MAPELLI, S.; KARANOV, E. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 24, n. 12, p. 1337–1344, 2001.
- ALVES, L. R.; MONTEIRO, C. C.; CARVALHO, R. F.; RIBEIRO, P. C.; TEZOTTO, T.; AZEVEDO, R. A.; GRATÃO, P. L. Cadmium stress related to root-to-shoot communication depends on ethylene and auxin in tomato plants. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 134, p. 102–115, 2017.
- BARBOSA, J. C.; MALDONATO JÚNIOR, W. **Experimentação Agronômica e Agroestat – Sistema para análises estatísticas de ensaios agronômicos**. 1. ed. Jaboticabal: Gráfica Multipress Ltda, 2015.
- BOARETTO, L. F.; CARVALHO, G.; BORGIO, L.; CRESTE, S.; LANDELL, M. G. A.; MAZZAFERA, P.; AZEVEDO, R. A. Water stress reveals differential antioxidant responses of tolerant and non-tolerant sugarcane genotypes. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 74, p. 165–175, 2014.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- CARVALHO, R. F.; MONTEIRO, C. C.; CAETANO, A. C.; DOURADO, M. N.; GRATÃO, P. L.; HADDAD, C. R. B.; PERES, L. E. P.; AZEVEDO, R. A. Leaf senescence in tomato mutants as affected by irradiance and phytohormones. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 57, n. 4, p. 749–757, 2013.
- CEMBROWSKA-LECH, D.; KOPROWSKI, M.; KĘPCZYŃSKI, J. Germination induction of dormant *Avena fatua* caryopses by KAR1 and GA3 involving the control of reactive oxygen species (H₂O₂ and O₂⁻) and enzymatic antioxidants (superoxide dismutase and catalase) both in the embryo and the aleurone layers. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 176, p. 169–179, 2015.
- DEMMIG-ADAMS, B. Carotenoids and photoprotection in plants: A role for the xanthophyll zeaxanthin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, Amsterdam, v. 1020, n. 1, p. 1–24, 1990.
- DIAO, M.; MA, L.; WANG, J.; CUI, J.; FU, A.; LIU, H. Selenium Promotes the Growth and Photosynthesis of Tomato Seedlings Under Salt Stress by Enhancing Chloroplast Antioxidant Defense System. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 33, n. 3, p. 671–682, 2014.
- FAIRWEATHER-TAIT, S. J.; BAO, Y.; BROADLEY, M. R.; COLLINGS, R.; FORD, D.; HESKETH, J. E.; HURST, R. Selenium in Human Health and Disease. **Antioxidants**

& Redox Signaling, New Rochelle, v. 14, n. 7, p. 1337–1383, 2011.

FENG, R.; WEI, C.; TU, S. The roles of selenium in protecting plants against abiotic stresses. **Environmental and Experimental Botany**, Elmosford, v. 87, p. 58–68, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.09.002>>.

FENG, T.; CHEN, S. S.; GAO, D. Q.; LIU, G. Q.; BAI, H. X.; LI, A.; PENG, L. X.; REN, Z. Y. Selenium improves photosynthesis and protects photosystem II in pear (*Pyrus bretschneideri*), grape (*Vitis vinifera*), and peach (*Prunus persica*). **Photosynthetica**, Prague, v. 53, n. 4, p. 609–612, 2015.

FILEK, M.; ZEMBALA, M.; KORNAŚ, A.; WALAS, S.; MROWIEC, H.; HARTIKAINEN, H. The uptake and translocation of macro- and microelements in rape and wheat seedlings as affected by selenium supply level. **Plant and Soil**, The Hague, v. 336, n. 1, p. 303–312, 2010.

GRATÃO, P. L.; MONTEIRO, C. C.; CARVALHO, R. F.; TEZOTTO, T.; PIOTTO, F. A.; PERES, L. E. P.; AZEVEDO, R. A. Biochemical dissection of diageotropica and Never ripe tomato mutants to Cd-stressful conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 56, p. 79–96, 2012.

GRATÃO, P. L.; MONTEIRO, C. C.; TEZOTTO, T.; CARVALHO, R. F.; ALVES, L. R.; PETERS, L. P.; AZEVEDO, R. A. Cadmium stress antioxidant responses and root-to-shoot communication in grafted tomato plants. **BioMetals**, London, v. 28, n. 5, p. 803–816, 2015.

GUERRERO, B.; LLUGANY, M.; PALACIOS, O.; VALIENTE, M. Dual effects of different selenium species on wheat. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 83, p. 300–307, 2014.

HAWRYLAK-NOWAK, B. Comparative effects of selenite and selenate on growth and selenium accumulation in lettuce plants under hydroponic conditions. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 70, n. 2, p. 149–157, 2013.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 125, n. 1, p. 189–198, 1968.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment Station Circular**, Berkeley, v. 347, n. 347, p. 1–32, 1950.

HOPPER, J. L.; PARKER, D. R. Plant availability of selenite and selenate as influenced by the competing ions phosphate and sulfate. **Plant and Soil**, The Hague, v. 210, n. 2, p. 199–207, 1999.

JIANG, C.; ZU, C.; LU, D.; ZHENG, Q.; SHEN, J.; WANG, H.; LI, D. Effect of

exogenous selenium supply on photosynthesis, Na⁺ accumulation and antioxidative capacity of maize (*Zea mays* L.) under salinity stress. **Scientific Reports**, London, v. 7, p. 42039, 2017.

JIANG, C.; ZU, C.; SHEN, J.; SHAO, F.; LI, T. Effects of selenium on the growth and photosynthetic characteristics of flue-cured tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, Warszawa, v. 84, n. 1, p. 71–77, 2015.

KARUPPANAPANDIAN, T.; MOON, J. C.; KIM, C.; MANOHARAN, K.; KIM, W. Reactive oxygen species in plants: Their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. **Australian Journal of Crop Science**, Melbourne, v. 5, n. 6, p. 709–725, 2011.

LI, H. F.; MCGRATH, S. P.; ZHAO, F. J. Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite. **New Phytologist**, Cambridge, v. 178, n. 1, p. 92–102, 2008.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. In: **Methods in Enzymology**. [s.l.: s.n.] 148 p. 350–382.

MAGER, W. H.; DE KRUIJFF, A. J. Stress-induced transcriptional activation. **Microbiological reviews**, Washington, v. 59, n. 3, p. 506–31, 1995.

NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Intracellular Redox Compartmentation and ROS-Related Communication in Regulation and Signaling. **Plant Physiology**, Cambridge, v. 171, n. 3, p. 1581–1592, 2016.

NOGUEIROL, R. C.; MONTEIRO, F. A.; GRATÃO, P. L.; BORGIO, L.; AZEVEDO, R. A. Tropical soils with high aluminum concentrations cause oxidative stress in two tomato genotypes. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 187, n. 3, p. 73, 2015.

PUCCINELLI, M.; MALORGIO, F.; PEZZAROSSA, B. Selenium Enrichment of Horticultural Crops. **Molecules**, Basel, v. 22, n. 6, p. 933, 2017.

RAMOS, S. J.; FAQUIN, V.; GUILHERME, L. R. G.; CASTRO, E. M.; ÁVILA, F. W.; CARVALHO, G. S.; BASTOS, C. E. A.; OLIVEIRA, C. Selenium biofortification and antioxidant activity in lettuce plants fed with selenate and selenite. **Plant, Soil and Environment**, Prague, v. 56, n. 12, p. 584–588, 2010.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany**, London, v. 2012, p. 1–26, 2012.

SORS, T. G.; ELLIS, D. R.; SALT, D. E. Selenium uptake, translocation, assimilation and metabolic fate in plants. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 86, n. 3, p. 373–389, 2005.

SUN, X.; ZHONG, Y.; HUANG, Z.; YANG, Y. Selenium Accumulation in Unicellular Green Alga *Chlorella vulgaris* and Its Effects on Antioxidant Enzymes and Content of Photosynthetic Pigments. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 11, p. e112270, 2014.

TEZOTTO, T.; FAVARIN, J. L.; PAULA NETO, A.; GRATÃO, P. L.; AZEVEDO, R. A.; MAZZAFERA, P. Simple procedure for nutrient analysis of coffee plant with energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry (EDXRF). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 70, n. 4, p. 263–267, 2013.

WANG, Y.-D.; WANG, X.; WONG, Y. Proteomics analysis reveals multiple regulatory mechanisms in response to selenium in rice. **Journal of Proteomics**, London, v. 75, n. 6, p. 1849–1866, 2012.

WHITE, P. J. Selenium accumulation by plants. **Annals of Botany**, London, v. 117, n. 2, p. 217–235, 2016.

WHITE, P. J.; BOWEN, H. C.; PARMAGURU, P.; FRITZ, M.; SPRACKLEN, W. P.; SPIBY, R. E.; MEACHAM, M. C.; MEAD, A.; HARRIMAN, M.; TRUEMAN, L. J.; SMITH, B. M.; THOMAS, B.; BROADLEY, M. R. Interactions between selenium and sulphur nutrition in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 404, p. 1927–1937, 2004.

WHITE, P. J.; BROADLEY, M. R. Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets – iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. **New Phytologist**, Cambridge, v. 182, p. 49–84, 2009.

ZHANG, M.; TANG, S.; HUANG, X.; ZHANG, F.; PANG, Y.; HUANG, Q.; YI, Q. Selenium uptake, dynamic changes in selenium content and its influence on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in rice (*Oryza sativa* L.). **Environmental and Experimental Botany**, Elmosford, v. 107, p. 39–45, 2014.