

Aplicação de fontes de selenito e selenato na micropropagação de *Digitalis mariana* Boiss. ssp. Heywoodii

Application of selenite and selenate sources in the micropropagation of *Digitalis mariana* Boiss. ssp. Heywoodii

Aplicación de fuentes de selenita y selenato en la micropropagación de *Digitalis mariana* Boiss. ssp. Heywoodii

Recebido: 26/12/2022 | Revisado: 03/01/2023 | Aceitado: 04/01/2023 | Publicado: 06/01/2023

Raíssa Couteiro Moura

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1557-2031>
Universidade Federal de Lavras, Brasil
E-mail: rcoultmoura@gmail.com

Jandeilson Pereira dos Santos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3708-2540>
Universidade Federal de Lavras, Brasil
E-mail: jandeilsonpereira@gmail.com

Rafael Marlon Alves de Assis

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8978-2867>
Universidade Federal de Lavras, Brasil
E-mail: rafamarlon7@gmail.com

João Pedro Miranda Rocha

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2699-4931>
Universidade Federal de Lavras, Brasil
E-mail: jjoamiranda7@gmail.com

Jeremias José Ferreira Leite

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2178-2972>
Universidade Federal de Lavras, Brasil
E-mail: jeremias12agro@gmail.com

Flávia Dionísio Pereira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8282-4059>
Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Brasil
E-mail: flavia1808@hotmail.com

Suzan Kelly Vilela Bertolucci

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8796-7043>
Universidade Federal de Lavras, Brasil
E-mail: suzan@ufla.br

José Eduardo Brasil Pereira Pinto

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1141-7907>
Universidade Federal de Lavras, Brasil
E-mail: jeduardo@ufla.br

Resumo

As espécies de *Digitalis lanata* e *Digitalis mariana* são exploradas industrialmente para a produção de digoxina e digitoxina, cardenólídeos empregados clinicamente na insuficiência cardíaca congestiva. Fatores ambientais, principalmente os fatores bióticos, interferem na produção vegetal. Problemas na produção convencional de *Digitalis mariana* por sementes têm afetado a produção de cardenólídeos pela planta. A cultura de tecidos vegetais é baseada na totipotencialidade das células e aplica diversas formas de cultura *in vitro*. Essa técnica tem sido usada para criar variabilidade genética e também micropropagação em larga escala de plantas para o mercado comercial. Em plantas, o selênio (Se) em baixas concentrações é benéfico para o metabolismo, e estimula o crescimento. Além disso há relatos que o Se pode ajudar as plantas a se manterem por mais tempo fisiologicamente ativas, aumentando a produção vegetal. Desta forma, objetivou-se avaliar a influência da aplicação de fontes de selênio no crescimento, teor de cardenólídeos totais e de pigmentos fotossintéticos de *Digitalis mariana* subsp. *heywoodii* cultivada *in vitro*. Foram testadas duas fontes de selênio: selenato de sódio e selenito de sódio nas concentrações de 0, 1, 10, 20, 50, 100 mg L⁻¹. Após 40 dias foram avaliados o crescimento, produção dos pigmentos fotossintéticos e a cardenólídeos. A fonte mais indicada para a espécie é o selenato, bem como a melhor concentração é a de 1mg L⁻¹, que promoveu crescimento na maior parte das variáveis avaliadas, além de aumentar a produção de clorofila *a*, clorofila *b*, carotenoides e

cardenólídeos. O uso de selênio no meio de cultivo de *D. mariana* subsp. *heywoodii* pode ser uma alternativa para otimizar o cultivo da espécie *in vitro*.

Palavras-chave: Biofortificação; Plantas medicinais; Cultura de tecidos; Selênio.

Abstract

The species of *Digitalis lanata* and *Digitalis mariana* are exploited industrially for the production of digoxin and digitoxin, cardenolides used clinically in congestive heart failure. Environmental factors, mainly biotic factors, interfere with plant production. Problems in the conventional production of *Digitalis mariana* by seeds have affected the production of cardenolides by the plant. Plant tissue culture is based on the totipotentiality of cells and applies various forms of *in vitro* culture. This technique has been used to create genetic variability and also large-scale micropropagation of plants for the commercial market. In plants, selenium (Se) at low concentrations is beneficial for metabolism and stimulates growth. In addition, there are reports that Se can help plants to remain physiologically active for longer, increasing plant production. Thus, the objective was to evaluate the influence of the application of selenium sources on the growth, total cardenolides and photosynthetic pigments of *Digitalis mariana* subsp. *heywoodii* cultivated *in vitro*. Two sources of selenium were tested: sodium selenate and sodium selenite at concentrations of 0, 1, 10, 20, 50, 100 mg L⁻¹. After 40 days, growth, production of photosynthetic pigments and cardenolides were evaluated. The most suitable source for the species is selenate, as well as the best concentration is 1mg L⁻¹, which promoted growth in most of the evaluated variables, in addition to increasing the production of chlorophyll *a*, chlorophyll *b*, carotenoids and cardenolides. The use of selenium in the *D. mariana* subsp. *heywoodii* can be an alternative to optimize the cultivation of the species *in vitro*.

Keywords: Biofortification; Medicinal plants; Tissue culture; Selenium.

Resumen

Las especies de *Digitalis lanata* y *Digitalis mariana* se explotan industrialmente para la producción de digoxina y digitoxina, cardenólidos utilizados clínicamente en la insuficiencia cardíaca congestiva. Los factores ambientales, principalmente factores bióticos, interfieren con la producción vegetal. Problemas en la producción convencional de *Digitalis mariana* por semillas han afectado la producción de cardenólidos por parte de la planta. El cultivo de tejidos vegetales se basa en la totipotencialidad de las células y aplica diversas formas de cultivo *in vitro*. Esta técnica se ha utilizado para crear variabilidad genética y también micropropagación a gran escala de plantas para el mercado comercial. En las plantas, el selenio (Se) en bajas concentraciones es beneficioso para el metabolismo y estimula el crecimiento. Además, hay reportes de que el Se puede ayudar a las plantas a permanecer fisiológicamente activas por más tiempo, aumentando la producción de las plantas. Así, el objetivo fue evaluar la influencia de la aplicación de fuentes de selenio sobre el crecimiento, cardenólidos totales y pigmentos fotosintéticos de *Digitalis mariana* subsp. *heywoodii* cultivada *in vitro*. Se probaron dos fuentes de selenio: selenato de sodio y selenito de sodio en concentraciones de 0, 1, 10, 20, 50, 100 mg L⁻¹. A los 40 días se evaluó el crecimiento, producción de pigmentos fotosintéticos y cardenólidos. La fuente más adecuada para la especie es el selenato, así como la mejor concentración es de 1 mg L⁻¹, que promovió el crecimiento en la mayoría de las variables evaluadas, además de incrementar la producción de clorofila *a*, clorofila *b*, carotenoides y cardenólidos. El uso de selenio en la *D. mariana* subsp. *heywoodii* puede ser una alternativa para optimizar el cultivo de la especie *in vitro*.

Palabras clave: Biofortificación; Plantas medicinales; Cultivo de tejidos; Selenio.

1. Introdução

As plantas medicinais tem importante atuação na saúde humana. Estima-se que 25% dos medicamentos prescritos em países industrializados contenham produtos vegetais naturais, enquanto nos países emergentes, cerca de 75% da população depende de remédios derivados de plantas (Canter *et al.*, 2005). Além disso, em alguns casos como medicamentos antitumorais e antimicrobianos, cerca de 60% dos medicamentos atualmente disponíveis no mercado e a maioria nos últimos estágios dos ensaios clínicos são derivados de produtos naturais, principalmente de plantas (Cragg *et al.*, 1997).

As espécies de *Digitalis lanata* e *Digitalis mariana* são exploradas industrialmente para a produção de digoxina e digitoxina, cardenólídeos empregados clinicamente na insuficiência cardíaca congestiva (Pádua *et al.*, 2012). O uso de extratos de *Digitalis* no tratamento de doenças cardíacas foi relatado pela primeira vez por William Withering em 1785 (Withering, 2014). Milhões de pessoas no mundo são portadoras de ICC e, no Brasil, estima-se que 6,4 milhões de pessoas sofram dessa doença (Freitas & Püschel, 2013).

De acordo com Mulabagal e Tsay (2004), os fatores ambientais, principalmente os fatores bióticos, interferem na produção vegetal. Problemas na produção convencional de *Digitalis mariana* por sementes têm afetado a produção de

cardenólídeos pela planta. Segundo Patil *et al.* (2013), a produção de heterosídeos cardiotônicos não supre a crescente demanda farmacêutica. Para suprir essa necessidade do mercado, técnicas biotecnológicas podem ser empregadas como forma alternativa de cultivo de *D. mariana*.

A produção de metabólitos secundários é geralmente maior em tecidos diferenciados, há tentativas de usar culturas de órgãos para a produção de compostos de importância medicinal (Wilken *et al.*, 2005). A cultura de tecidos vegetais é baseada na totipotencialidade das células e aplica diversas formas de cultura *in vitro*. Essa técnica tem sido usada para criar variabilidade genética e também micropropagação em larga escala de plantas para o mercado comercial (Kreis, 2017). Da Silva *et al.* (2022) reportaram que a combinação dos reguladores de crescimento do grupo da citocinina (BAP e TDZ) aumentaram a produção total de cardenólídeos totais *in vitro* em *Digitalis mariana* Boiss. ssp. *Heywoodii*. Estes mesmos autores demonstraram que a intensidade de luz e o espectro de luz na combinação de comprimento de onda azul/vermelho estimulou a produção de biomassa de brotos e elevou os teores totais de cardenólídeos.

O Selênio (Se) era considerado um elemento tóxico, até que em 1957 foi considerado um mineral essencial para diversos organismos (Schwarz & Foltz, 1957). O selênio (Se) é um micronutriente essencial de animais a humanos, e é um importante componente de selenoproteínas, glutathione peroxidase (GPx) e tioredoxina redutase (TrxR), que regulam a resposta ao estresse oxidativo celular através da resposta redox sistema (Xiang *et al.*, 2022). Em plantas, o Se em baixas concentrações é benéfico para o metabolismo, estimula o crescimento e a biofortificação (Castiglioni *et al.*, 2021; Pilon-Smits *et al.*, 2009; Possamai *et al.*, 2022; Soldá *et al.*, 2020). Além disso há relatos que o Se pode ajudar as plantas a se manterem por mais tempo fisiologicamente ativas, aumentando a produção vegetal (Ramos *et al.*, 2011). Xiang *et al.* (2022) reportaram que o conteúdo de Se total em folhas de chá aumentam e promovem o acúmulo de polifenóis, teanina, flavonóides e metabólitos secundários voláteis, melhorando assim a qualidade nutricional de folhas de chá. Li *et al.* (2022) também reportaram que a adição de selenato ou selenito à solução nutritiva aumentou significativamente o teor de Se na alface. Os autores mostraram que a alface tem forte potencial de biofortificação e pode ser usado como o principal candidato a vegetais suplementados com Se. Além disso, doses o selênio planta em pequenas concentrações pode ser considerado como um antioxidante, agindo como um bioestimulante da, promovendo o crescimento e aumentando a resistência a estresses abióticos, como por exemplo, o déficit hídrico (Mangarotti *et al.*, 2020).

O cultivo *in vitro* de *D. mariana* pode ser uma alternativa para suprir a carência de heterosídeos cardiotônicos na indústria farmacêutica. Desta forma, objetivou-se avaliar a influência da aplicação de fontes de selênio no crescimento, teor de cardenólídeos totais e de pigmentos fotossintéticos de *Digitalis mariana* subsp. *heywoodii* cultivada *in vitro*.

2. Metodologia

2.1 Estabelecimento do material vegetal *in vitro*

O experimento foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos e Plantas Medicinais do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), MG. Para o estabelecimento do material vegetal *in vitro* foram utilizadas sementes de *Digitalis mariana* subsp. *heywoodii* (Jelitto Seeds®, Alemanha). As sementes passaram por um processo de assepsia em uma solução de hipoclorito de sódio a 50 % sob agitação por 10 minutos e, em câmara de fluxo laminar, lavados cinco vezes em água destilada e autoclavada. Após a desinfestação as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 3% de sacarose e 0,5 % de ágar, pH ajustado para $\pm 5,7$, e posteriormente mantidos em sala de crescimento com fotoperíodo de 16 horas de luz, temperatura de 25 ± 2 °C e intensidade luminosa de $39 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

2.2 Aplicação de fontes de selênio

Após 20 dias de germinação das sementes, as plântulas foram individualizadas e inoculadas em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio MS líquido suplementado com 3% de sacarose, fontes de silício em diferentes concentrações e pH ajustado para $\pm 5,7$. Suportes feitos com papel filtro foram utilizados para sustentação da plântula no meio de cultivo líquido. Foram testadas duas fontes de selênio: selenato de sódio e selenito de sódio nas concentrações de 0, 1, 10, 20, 50 e 100 mg L⁻¹.

Após 40 dias foram avaliados o crescimento e a produção dos pigmentos fotossintéticos. O crescimento das plântulas foi avaliado quanto aos números de folhas (NF), comprimento de raiz (CR, cm), biomassas secas de folha (BSF, mg), raiz (BSR, mg) e total (BST, mg) e razão parte aérea/raiz. A determinação das matérias secas foi realizada por meio da secagem do material vegetal, em estufa de circulação forçada de ar a 70 °C, até a obtenção do peso constante.

2.3 Quantificação de pigmentos fotossintéticos

A extração dos pigmentos clorofila *a*, *b*, clorofila total (*a+b*) e carotenoides foi realizada segundo Santos *et al.* (2015) com as seguintes adaptações para o método: quantidade do material vegetal e do solvente dimetilsulfóxido (DMSO) não saturado com CaCO₃. Foram utilizados 50 mg de matéria fresca de folhas, sem a nervura central. Em seguida, o material vegetal foi incubado em 10 mL de DMSO, em tubos Falcon envoltos em folha de alumínio e colocado em estufa sob temperatura de 65 °C, durante 24 horas. Após esse período, alíquotas das soluções (3 mL) foram transferidas para uma cubeta de quartzo com volume de 3 cm³ para realização das leituras de absorbância em espectro TECAN INFINITY M200 PRO operado com o sistema de processamento de dados I-control® versão 3.37. Utilizando-se os comprimentos de onda 480, 649 e 665 nm para carotenoides, clorofila *b* e *a*, respectivamente. Foi feita a leitura do branco, utilizando-se como apenas o DMSO. Todas as leituras foram realizadas em triplicata.

A partir das leituras obtidas determinou-se a concentração das clorofilas *a*, *b* e carotenoides utilizando-se as equações propostas por Wellburn (1994): Clorofila *a* = (12,47 x A665) – (3,62 x A649); clorofila *b* = (25,06 x A649) – (6,5 x A665); carotenoides: (1000 x A480 – 1,29 x Ca – 53,78 x Cb)/220, e a clorofila total por meio da soma dos resultados encontrados das equações para clorofila *a* e *b*, sendo os resultados expressos em mg g⁻¹.

2.4 Extração de cardenolídeos

A extração de cardenolídeos seguiu o protocolo proposto por Kreis, Haug e Yücesan (2017), com modificações. Folhas secas em estufa ventilada a 70°C foram pulverizadas. Uma massa de cerca de 50 mg de folhas pulverizadas foi extraída com 1 mL de etanol a 70% (v/v) a 70 °C por sonicação, utilizando-se 1 ciclo ininterrupto de 30 min. Após esse período, o extrato ficou por 5 min em gelo, e então microcentrifugado a 13000 g por 10 min. Em seguida, foram adicionados ao sobrenadante 300 µL de acetato de chumbo a 15% (p/v). Após incubação de 5 minutos a temperatura ambiente, as amostras foram novamente microcentrifugadas. Uma vez removido o precipitado, 200 µL de solução aquosa de fosfato monossódico (Na₂HPO₂) a 10% (p/v) foram adicionados ao sobrenadante, e, em seguida, microcentrifugado. O sobrenadante foi transferido em partes iguais para dois microtubos e a eles adicionado 1 mL de clorofórmio:isopropanol (3:2 v/v), que foram microcentrifugados a 13000 g durante 5 min. A fase inferior foi transferida para um balão e, então rotaevaporada até secura.

2.5 Reação de coloração e leitura das absorbâncias

Para a quantificação dos cardenolídeos foi adicionado ao resíduo da extração um volume de 2 mL de metanol, seguido de sonicação até dissolução completa (1-2 min). A solução metanólica foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL, e em seguida, foram adicionados 5 mL de reagente de Baljet (95 mL de ácido pícrico a 1% + 5 mL de solução aquosa de NaOH a 10%), completando-se o volume com MeOH. Após 20 minutos de reação, as leituras a 494 nm foram determinadas, frente ao

branco. O branco foi adquirido transferindo-se 5 mL de reagente de Baljet para um balão volumétrico de 10 mL e completando-se o volume com MeOH.

Para cada solução elaborou-se uma solução de compensação misturando-se 2 mL de solução metanólica da amostra obtida conforme descrito anteriormente, e diluindo para 10 mL com MeOH. O valor de absorvância obtido para a solução de compensação foi subtraído da leitura obtida para a amostra. Os ensaios foram realizados em triplicata.

As leituras de absorção molecular no ultravioleta foram mensuradas em microplacas em espectrofotômetro TECAN Infinity® M200 PRO operado pelo software I-control® versão 3.37. A substância de referência utilizada nos ensaios foi a β -metildigitoxina, com grau de pureza de 97% (CLAE).

2.6 Doseamento dos cardenólídeos totais

O doseamento de cardenólídeos totais foi realizado por espectrofotometria de absorção no ultravioleta, empregando método analítico validado. O preparo das amostras e as leituras das absorvâncias para a determinação dos teores de cardenólídeos totais nas amostras de folhas de *D. mariana* subsp. *heywoodii*, cultivadas sob fontes de selênio, foram obtidos conforme descrito nos itens 2.4 e 2.5. Com base nos parâmetros da curva analítica, chegou-se a equação utilizada para o cálculo dos teores percentuais de cardenólídeos totais (%CT), expressos em β -metildigitoxina: $\%CT = 0,283x(A+0,0213)/m$ (g). Onde: A corrigida = absorvância corrigida a 494 nm, m = massa do material vegetal em grama (neste caso foi 0,05g).

2.7 Análises estatísticas

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com doze tratamentos, quatro repetições e doze plântulas por tratamento. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade. O programa estatístico Statistica versão 13.4.0.14 foi utilizado para análise dos dados.

3. Resultados e Discussão

A suplementação de fontes de selênio no meio de cultivo MS sob diferentes concentrações alterou o crescimento, produção de pigmentos fotossintetizantes e a produção de heterosídeos cardioativos (Tabela 1). Observou-se o desenvolvimento da parte aérea em todos os tratamentos. O crescimento da plântula foi afetado por concentrações superiores a 10 mg L⁻¹ tanto de selenito como de selenato. A fonte de selenito e selenato na concentração 1 mg L⁻¹ proporcionou maiores resultados para quase todos os tratamentos.

A aplicação de selênio foi benéfica no crescimento in vitro de *D. mariana*. Um aumento significativo do número de folhas foi observado na concentração de selenito a 1 mg L⁻¹. Hawrylak-Nowak *et al.* (2015) também registrou aumento do número de folhas ao suplementar o meio de cultivo com selenito. Altos níveis de selênio reduziram o número de folhas e provocaram oxidação corroborando com Fargašová (2011), que observou que selênio em altas concentrações inibiu o crescimento de *Sinapis alba*. Seliem *et al.* (2020) também reportaram que baixas doses de Se (até 6 mg L⁻¹) apresentaram efeitos promotores de crescimento, enquanto os níveis mais elevados de Se a 8 e 10 mg L⁻¹ foram associados com toxicidade e anormalidade na folha (apareceu como amarelecimento de folhas) e mau funcionamento do desenvolvimento radicular. Sotoodehnia-Korani *et al.* (2020) reportaram que a incorporação de nanopartículas de selênio (nSe) no meio de cultura causou variações na morfologia e no crescimento de maneira dependente da dose e do tipo de Se em *Capsicum annuum*. As baixas doses de nSe apresentaram efeitos promotores de crescimento, enquanto nSe em 10 e 30 mg L⁻¹ foram associados com toxicidade severa e anormalidades no desenvolvimento foliar e radicular de *Capsicum annuum*.

Tabela 1 - NF (número de folhas); CR (comprimento de raiz), BSR (biomassa seca de raiz); BSF (biomassa seca de folha); BST (biomassa seca total); R:Pa (razão raiz e parte aérea); Cl a (clorofila a); Cl b (clorofila b) e carotenoides de *D. mariana* subsp. *heywoodii* cultivadas sob fontes e concentrações de selênio. MF: matéria fresca.

| Fontes | Dose (mg L ⁻¹) | NF | CR (cm) | BSR (mg) | BSF (mg) | BST (mg) | R:Pa | Cl a (mg g ⁻¹ MF) | Cl b (mg g ⁻¹ MF) | Carotenoides (mg g ⁻¹ MF) | Cardenolideos (%) |
|--------------------|----------------------------|---------|---------|----------|----------|----------|--------|------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|-------------------|
| Selenito | 0 | 15,30 b | 4,63 c | 19,00 a | 74,75 a | 93,75 a | 0,25 a | 0,09 f | 0,17 b | 0,02 d | 0,12 d |
| | 1 | 22,08 a | 5,99 b | 15,67 b | 67,33 a | 83,00 a | 0,23 a | 0,14 e | 0,06 d | 0,04 c | 0,27 b |
| | 10 | 13,80 b | 5,74 b | 13,00 b | 65,00 a | 78,00 b | 0,20 a | 0,60 b | 0,18 b | 0,14 a | 0,16 c |
| | 20 | 10,60 c | 2,27 e | 5,67 c | 46,00 c | 51,67 c | 0,12 b | 0,02 g | 0,02 e | 0,05 c | 0,15 c |
| | 50 | 10,30 c | 1,94 e | 1,75 c | 35,50 c | 37,25 d | 0,05 b | 0,02 g | 0,03 e | 0,02 d | 0,10 e |
| | 100 | 5,48 d | 1,60 e | 1,10 c | 15,33 d | 16,43 d | 0,08 b | 0,01 g | 0,01 f | 0,01 d | 0,05 f |
| Selenato | 0 | 15,30 b | 4,63 c | 19,00 a | 74,75 a | 93,75 a | 0,25 a | 0,09 f | 0,17 b | 0,02 d | 0,12 d |
| | 1 | 13,81 b | 7,18 a | 23,00 a | 72,75 a | 95,75 a | 0,33 a | 0,73 a | 0,24 a | 0,15 a | 0,31 a |
| | 10 | 11,73 c | 3,72 d | 11,67 b | 51,25 b | 62,92 b | 0,24 a | 0,45 c | 0,05 d | 0,11 b | 0,17 c |
| | 20 | 10,16 c | 4,07 c | 7,33 c | 59,25 b | 66,58 b | 0,13 b | 0,27 d | 0,08 c | 0,06 c | 0,13 d |
| | 50 | 7,75 d | 2,09 e | 3,67 c | 55,00 b | 58,67 c | 0,07 b | 0,02 g | 0,02 e | 0,02 d | 0,11 d |
| | 100 | 6,09 d | 2,85 d | 2,50 c | 31,67 c | 34,17 d | 0,08 b | 0,01 g | 0,02 e | 0,01 d | 0,10 e |
| Médias para fontes | | | | | | | | | | | |
| Selenito | | 12,93 a | 3,69 a | 9,36 a | 50,65 a | 60,02 a | 0,16 a | 0,15 b | 0,08 b | 0,05 b | 0,14 b |
| Selenato | | 10,81 a | 4,09 a | 11,19 a | 57,44 a | 68,64 a | 0,18 a | 0,26 a | 0,10 a | 0,06 a | 0,16 a |
| Médias para doses | | | | | | | | | | | |
| 0 | | 15,30 b | 4,63 b | 19,00 a | 74,75 a | 93,75 a | 0,25 a | 0,09 d | 0,17 a | 0,02 d | 0,12 d |
| 1 | | 17,94 a | 6,59 a | 19,33 a | 70,04 a | 89,38 a | 0,28 a | 0,43 b | 0,15 b | 0,10 b | 0,29 a |
| 10 | | 12,77 b | 4,73 b | 12,33 b | 58,13 b | 70,46 b | 0,22 a | 0,53 a | 0,12 c | 0,13 a | 0,16 b |
| 20 | | 10,38 c | 3,17 c | 6,50 c | 52,63 b | 59,13 c | 0,13 b | 0,15 c | 0,05 d | 0,05 c | 0,14 c |
| 50 | | 9,03 c | 2,01 d | 2,71 c | 45,25 c | 47,96 c | 0,06 c | 0,02 e | 0,02 e | 0,02 d | 0,11 e |
| 100 | | 5,78 d | 2,22 d | 1,80 c | 23,50 d | 25,30 d | 0,08 c | 0,01 e | 0,01 e | 0,01 d | 0,08 f |

Médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente entre si no teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Fonte: Autores.

Outro trabalho mostrou que nanopartículas de selênio (nSe) nas concentrações de 0,1 a 1,5 mg L⁻¹ promoveram o crescimento *in vitro* de plântulas de gerbera, tal como altura da planta, comprimento da folha, teor total de clorofila, biomassa de plântulas (Khai *et al.*, 2022). No entanto, nSe mostraram atividade inibitória em 3 mg L⁻¹ com uma diminuição no crescimento da parte aérea, raiz, bem como fechamento estomático em comparação com os outros tratamentos.

A concentração de 1 mg L⁻¹ de selenato aumentou o comprimento de raízes, enquanto que as concentrações de 50 e 100 mg L⁻¹ foi tóxico. Há cada vez mais evidências de que o enriquecimento de plantas por Se pode exercer efeitos benéficos sobre o seu crescimento, capacidade antioxidante e tolerância ao estresse (Hartikainen, 2005).

A toxicidade do selênio em plantas ocorre nas plantas quando o a concentração ótima de Se excede. A toxicidade causada pelo selênio pode acontecer por dois mecanismos, um dos quais é a má formação de seleno proteínas e outro induzindo estresse oxidativo. Ambos os mecanismos são conhecidos por serem prejudiciais para plantas de uma ou outra forma.

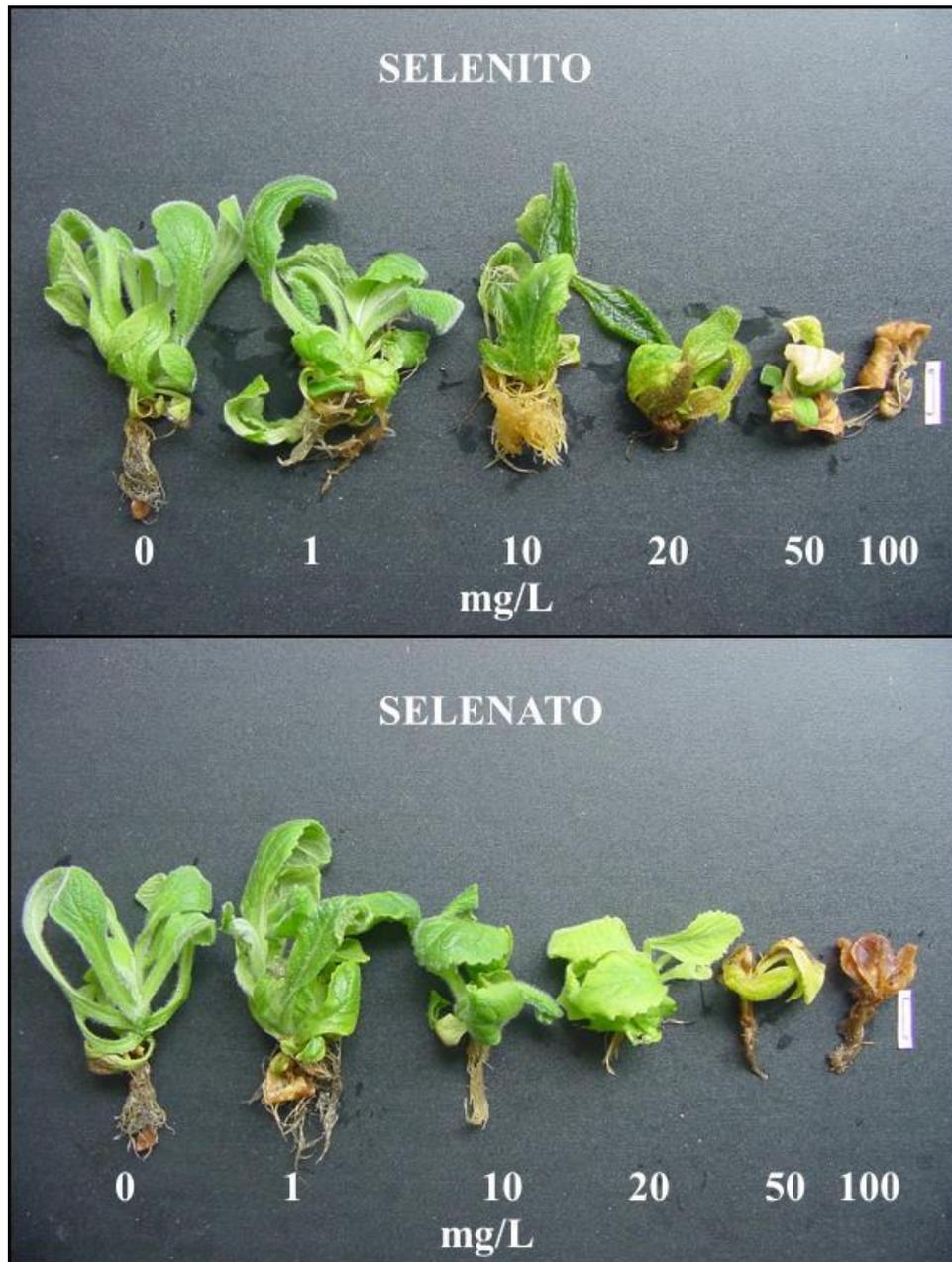
Em baixa concentração, o selenato promoveu aumento de biomassa seca de raiz e biomassa seca total, diminuindo em altas concentrações (Tabela 1 e Figura 1). Seliem *et al.* (2020) confirmou que a suplementação no meio MS com Se (até 6 mg L⁻¹) e nano-Se (até 50 mg L⁻¹) na presença de NAA melhorou o enraizamento e aclimatização da orquídea *Phalaenopsis*. A essencialidade de Se para plantas não foi estabelecida até hoje, embora tenha havido relatos de efeitos benéficos de Se no crescimento de plantas de hiperacumuladores e, em doses baixas, de plantas não hiperacumuladoras (Hartikainen, 2005).

Foi observado que a concentração de 1 mg L⁻¹ de selenato e 10 mg L⁻¹ de selenito aumentaram a produção dos pigmentos fotosintéticos como Clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides. O aumento na produção de pigmentos fotossintéticos pode ser explicado pelas propriedades contra dessecação do selênio em baixas concentrações (Kumar *et al.*, 2012). De maneira geral, a maior oferta de nutrientes está relacionada ao aumento da concentração de clorofila, da eficiência fotoquímica (FV/FM) e de fotoassimilados (Iivonen *et al.*, 2001). Uma avaliação precisa da taxa fotossintética é crítica para analisar o impacto das condições ambientais em um aparato fotossintético da planta e produtividade (Millan-Almaraz *et al.*, 2009). Zsiros *et al.* (2019) mostraram o efeito tóxico de 10 mg L⁻¹ selenato está associado com a perturbação da estrutura e função da maquinaria fotossintética e retardou o crescimento da planta; também levou a uma diminuição do teor de clorofila.

O meio suplementado com selenito e selanto na concentração acima de 50 mg L⁻¹ inibiu a síntese de cardenolídeos totais. Foi observado aumento significativo no percentual de cardenolídeos totais no tratamento de selenato e selenito a 1 mg L⁻¹. O meio suplementado com selenito na concentração de 1 mg L⁻¹ houve um incremento de 2,25 vezes em relação ao controle e de selenato de 2,58 vezes. O aumento de cardenolídeos usando técnica de cultivo *in vitro* também foi registrado por Pérez-Alonso *et al.* (2018). Abordagens biotecnológicas, especificamente a cultura de tecidos vegetais desempenha um papel vital na busca de alternativas para a produção compostos medicinais de plantas (Rao & Ravishankar, 2002).

Em outro estudo, Patil *et al.* (2013) avaliaram o efeito de reguladores de crescimento em *Digitalis mariana*, na produção de digitoxina e digoxina, principais cardenolídeos da espécie, verificaram que as auxinas isoladas promoveram o acúmulo desses cardenolídeos, mas a combinação com citocininas, dentre elas o BAP ou TDZ, diminui a eficiência da espécie em produzir os cardenolídeos. Da Silva *et al.* (2022) reportaram que o meio MS suplementado com 0,375 mg L⁻¹ de BAP + 0,125 mg L⁻¹ de TDZ houve uma indução de maior número de brotos, produção de biomassa e altos rendimentos de cardenolídeos totais em *Digitalis mariana* Boiss. ssp. Heywoodii. Além disso, demonstraram que a intensidade de luz de 139 μmol m⁻² s⁻¹ induziu melhor crescimento e produção elevada de cardenolídeos e a combinação do comprimento de onda no azul e vermelho permitiu o desenvolvimento de brotos, produção de biomassa e maiores rendimentos de cardenolídeos totais.

Figura 1 - Plântulas de *D. mariana* cultivadas com selenito e selenato em diferentes concentrações (mg L^{-1}).



Fonte: Autores.

Na Figura 1 é possível observar que as doses de selenato e selenito afetaram o crescimento da parte aérea e radicular da espécie *D. mariana*.

4. Conclusão

O uso de selênio no meio de cultivo de *D. mariana* subsp. *heywoodii* pode ser uma alternativa para otimizar o cultivo da espécie *in vitro*. A fonte mais indicada para a espécie é o selenato, bem como a melhor concentração é a de 1 mg L^{-1} , que promoveu crescimento na maior parte das variáveis avaliadas, além de aumentar a produção de clorofila *a*, clorofila *b*, carotenoides e cardenólídeos. Pesquisas futuras devem ser realizadas para verificar se as plantas cultivadas *in vitro* com doses de selenato e selenito promovem a biofortificação da espécie *D. mariana* quando cultivadas em campo.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade Federal de Lavras - UFLA pelo suporte e estrutura. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior – Brasil (CAPES – Finance Code 001) pela bolsa de produtividade, apoio técnico e pelo apoio financeiro.

Referências

- Canter, P. H., Thomas, H., & Ernst, E. (2005). Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 23(4), 180-185.
- Castiglioni, G. L., Freitas, F. F., Moura, C. J. d., & Oliveira, M. A. A. d. (2021). Biosorption study of magnesium, zinc, iron and selenine in *Spirulina platensis* high concentration crops. *Research, Society and Development*, 10(2), e3910212154.
- Cragg, G. M., Newman, D. J., & Snader, K. M. (1997). Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products*, 60(1), 52-60.
- da Silva, G. M., Mohamed, A., de Carvalho, A. A., Pinto, J. E. B. P., Braga, F. C., de Pádua, R. M., Kreis, W., & Bertolucci, S. K. V. (2022). Influence of the wavelength and intensity of LED lights and cytokinins on the growth rate and the concentration of total cardenolides in *Digitalis mariana* Boiss. ssp. *heywoodii* (P. Silva and M. Silva) Hinz cultivated in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 151(1), 93-105.
- Fargašová, A. (2011). Toxicity comparison of some possible toxic metals (Cd, Cu, Pb, Se, Zn) on young seedlings of *Sinapis alba* L. *Plant, Soil and Environment*, 50(1), 33-38.
- Freitas, M. T. S. d., & Püschel, V. d. A. A. (2013). Heart failure: expressions of personal knowledge about the disease. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, 47(04), 922-930.
- Hartikainen, H. (2005). Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 18(4), 309-318.
- Hawrylak-Nowak, B., Matraszek, R., & Pogorzelec, M. (2015). The dual effects of two inorganic selenium forms on the growth, selected physiological parameters and macronutrients accumulation in cucumber plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(2), 41.
- Iivonen, S., Rikala, R., & Vapaavuori, E. (2001). Seasonal root growth of Scots pine seedlings in relation to shoot phenology, carbohydrate status, and nutrient supply. *Canadian Journal of Forest Research*, 31(9), 1569-1578.
- Khai, H. D., Mai, N. T. N., Tung, H. T., Luan, V. Q., Cuong, D. M., Ngan, H. T. M., Chau, N. H., Buu, N. Q., Vinh, N. Q., Dung, D. M., & Nhut, D. T. (2022). Selenium nanoparticles as in vitro rooting agent, regulates stomata closure and antioxidant activity of gerbera to tolerate acclimatization stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 150(1), 113-128.
- Kreis, W. (2017). The foxgloves (*Digitalis*) revisited. *Planta Med*, 83(12/13), 962-976.
- Kumar, M., Bijo, A. J., Baghel, R. S., Reddy, C. R. K., & Jha, B. (2012). Selenium and spermine alleviate cadmium induced toxicity in the red seaweed *Gracilaria dura* by regulating antioxidants and DNA methylation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 51, 129-138.
- Li, Y., Xiao, Y., Hao, J., Fan, S., Dong, R., Zeng, H., Liu, C., & Han, Y. (2022). Effects of selenate and selenite on selenium accumulation and speciation in lettuce. *Plant Physiology and Biochemistry*, 192, 162-171.
- Mangarotti, D. P. d. O., Rezende, R., Saath, R., Hachmann, T. L., Matumoto-Pintro, P. T., & Anjo, F. A. (2020). Use of selenium to increase antioxidant activity and water use efficiency in arugula (*Eruca vesicaria* ssp. *Sativa*) exposed to drought stress. *Research, Society and Development*, 9(12), e3291210670.
- Millan-Almaraz, J. R., Guevara-Gonzalez, R. G., Romero-Troncoso, R., Osornio-Rios, R. A., & Torres-Pacheco, I. (2009). Advantages and disadvantages on photosynthesis measurement techniques: A review. *African Journal of Biotechnology*, 8(25).
- Mulabagal, V., & Tsay, H.-S. (2004). Plant cell cultures - an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *International Journal of Applied Science and Engineering*, 2(1), 29-48.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Pádua, R. M. d., Meitingner, N., Filho, J. D. d. S., Waibel, R., Gmeiner, P., Braga, F. C., & Kreis, W. (2012). Biotransformation of 21-O-acetyl-deoxycorticosterone by cell suspension cultures of *Digitalis lanata* (strain W.1.4). *Steroids*, 77(13), 1373-1380.
- Patil, J. G., Ahire, M. L., Nitaware, K. M., Panda, S., Bhatt, V. P., Kishor, P. B. K., & Nikam, T. D. (2013). In vitro propagation and production of cardiotoxic glycosides in shoot cultures of *Digitalis purpurea* L. by elicitation and precursor feeding. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(6), 2379-2393.
- Pérez-Alonso, N., Martín, R., Capote, A., Pérez, A., Kairúz Hernández-Díaz, E., Rojas, L., Jiménez, E., Quiala, E., Angenon, G., Garcia-Gonzales, R., & Chong-Pérez, B. (2018). Efficient direct shoot organogenesis, genetic stability and secondary metabolite production of micropropagated *Digitalis purpurea* L. *Industrial Crops and Products*, 116, 259-266.
- Pilon-Smits, E. A. H., Quinn, C. F., Tapken, W., Malagoli, M., & Schiavon, M. (2009). Physiological functions of beneficial elements. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(3), 267-274.

- Possamai, A. C. S., Lobo, F. d. A., Previn, R., Perius, S. d. S., Liparotti, J. d. P., Morzelle, M. C., Domingues, Y. O., & Tomás, M. d. G. (2022). Accessibility of selenium after in vitro gastrointestinal simulation in biofortified rice genotypes with selenium. *Research, Society and Development*, 11(16), e427111636349.
- Ramos, S. J., Rutzke, M. A., Hayes, R. J., Faquin, V., Guilherme, L. R. G., & Li, L. (2011). Selenium accumulation in lettuce germplasm. *Planta*, 233(4), 649-660.
- Rao, R. S., & Ravishankar, G. A. (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20(2), 101-153.
- Santos, R. P., Da Cruz, A. C. F., Iarema, L., Kuki, K. N., & Otoni, W. C. (2015). Protocolo para extração de pigmentos foliares em porta-enxertos de videira micropropagados. *Ceres*, 55(4).
- Schwarz, K., & Foltz, C. M. (1957). Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. *Journal of the American Chemical Society*, 79(12), 3292-3293.
- Seliem, M. K., Abdalla, N., & El-Ramady, H. R. (2020). Response of *Phalaenopsis* Orchid to delenium and bio-nano-selenium: in vitro rooting and acclimatization. *Environment, Biodiversity and Soil Security*, 4(Issue 2020), 277-290.
- Soldá, N. M., Glombowsky, P., Rosseto, L., Tomasi, T., Santin Junior, I. A., Zampar, A., Silva, A. S. D., & Cucco, D. d. C. (2020). Different sources of selenium added to whole corn grain diet in the finishing phase of Angus steers.
- Sotoodehnia-Korani, S., Iranbakhsh, A., Ebadi, M., Majd, A., & Oraghi Ardebili, Z. (2020). Selenium nanoparticles induced variations in growth, morphology, anatomy, biochemistry, gene expression, and epigenetic DNA methylation in *Capsicum annuum*; an in vitro study. *Environmental Pollution*, 265, 114727.
- Wellburn, A. R. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144(3), 307-313.
- Wilken, D., Jiménez González, E., Hohe, A., Jordan, M., Gomez Kosky, R., Schmeda Hirschmann, G., & Gerth, A. (2005). Comparison of secondary plant metabolite production in cell suspension, callus culture and temporary immersion system. In A. K. Hvoslef-Eide & W. Preil (Eds.), *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation* (pp. 525-537). Springer Netherlands.
- Withering, W. (2014). *An account of the foxglove, and some of its medical uses*. Cambridge University Press.
- Xiang, J., Rao, S., Chen, Q., Zhang, W., Cheng, S., Cong, X., Zhang, Y., Yang, X., & Xu, F. (2022). Research progress on the effects of selenium on the growth and quality of tea plants. *Plants*, 11(19).
- Zsiros, O., Nagy, V., Párducz, Á., Nagy, G., Ünneper, R., El-Ramady, H., Prokisch, J., Lisztes-Szabó, Z., Fári, M., Csajbók, J., Tóth, S. Z., Garab, G., & Domokos-Szabolcsy, É. (2019). Effects of selenate and red Se-nanoparticles on the photosynthetic apparatus of *Nicotiana tabacum*. *Photosynthesis Research*, 139(1), 449-460.