



TÚLIO SILVA LARA

**BIOFORTIFICAÇÃO AGRONÔMICA COM
SELÊNIO E ALTERAÇÕES METABÓLICAS EM
TRIGO**

LAVRAS - MG

2016

TÚLIO SILVA LARA

**BIOFORTIFICAÇÃO AGRONÔMICA COM SELÊNIO E
ALTERAÇÕES METABÓLICAS EM TRIGO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Luiz Roberto Guimarães Guilherme

Orientador

Prof. Dr. Guilherme Lopes

Coorientador

LAVRAS – MG

2016

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Lara, Túlio Silva.

Biofortificação Agronômica com selênio e alterações
metabólicas em trigo/ Túlio Silva Lara. – Lavras: UFLA, 2016.
119 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2016.
Orientador: Luiz Roberto Guimarães Guilherme.
Bibliografia.

1. Elemento benéfico. 2. *Triticum aestivum* 3. Campo. 4.
Selenato. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

TÚLIO SILVA LARA

**BIOFORTIFICAÇÃO AGRONÔMICA COM SELÊNIO E
ALTERAÇÕES METABÓLICAS EM TRIGO**

**AGRONOMIC BIOFORTIFICATION WITH SELENIUM AND
METABOLIC CHANGES IN WHEAT**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 22 de abril de 2016.

Prof. Dr. Guilherme Lopes	UFLA
Dr. Guilherme Amaral de Souza	V-Agro
Prof. Dr. Fabrício William de Ávila	UNICENTRO
Profa. Dra. Cynthia de Oliveira	UFLA

Prof. Dr. Luiz Roberto Guimarães Guilherme
Orientador

LAVRAS – MG

2016

Aos meus pais, Odécio e Élide, pelo exemplo de vida e educação.

Ao meu irmão Talisson (*in memoriam*), sua passagem foi rápida, mas muito significativa.

À minha filha Olívia e ao meu sobrinho Otávio, as razões por eu nunca querer desistir.

À minha esposa, Thaís, pelo carinho e compreensão.

À família Lara, em especial ao Tio Rogério, o maior incentivador para eu cursar a pós-graduação e a Nathália, pelas horas ininterruptas de conversas.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

À Universidade Federal de Lavras e ao departamento de Fisiologia Vegetal, pela oportunidade da realização da pós-graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Luiz Roberto Guimarães Guilherme, pela orientação, ensinamentos, confiança e pelo exemplo profissional.

À EPAMIG, por ceder à área experimental onde foi desenvolvido o experimento.

À Kamila, pela ajuda na execução de todo o trabalho realizado em laboratório e ao Prof. Dr. Donizeti, por liberar a utilização do Laboratório de Metabolismo de Plantas.

Aos colegas do DCS, em especial Rômulo, Fábio, Guilherme e Cynthia, pela ajuda na execução do trabalho em campo.

Aos membros da banca pela contribuição e disponibilidade.

Aos professores do programa de Fisiologia Vegetal, pelos ensinamentos e boas conversas.

Aos funcionários do departamento de Fisiologia Vegetal, pela ajuda, compreensão e solidariedade.

Aos colegas do curso, que se tornaram parte da minha família.

Às Republicas Balaio e Lobo Mau, pois foi onde tudo começou.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!

RESUMO GERAL

O selênio é um elemento essencial aos humanos e animais. A deficiência deste mineral está presente em mais de um bilhão de pessoas no mundo. A biofortificação agronômica (via suprimento solo ou folha de Se) é uma estratégia eficiente para se combater essa deficiência. Além disso, o selênio é um elemento benéfico aos vegetais. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivos: i) comparar alternativas para a biofortificação agronômica do trigo com Se em campo, visando seu uso na alimentação humana; e ii) avaliar os efeitos do Se na produção e no acúmulo de biomassa vegetal. O selênio foi suprido às plantas de trigo em diferentes concentrações (12, 21, 38, 68 e 120 g ha⁻¹ de Se), na forma de selenato. Foram realizados dois estudos. No primeiro, o fornecimento do Se foi via solo. No segundo, o fornecimento do Se foi via folha, dividido em duas aplicações de concentrações iguais. Em ambos os estudos foram realizadas análises bioquímicas e agronômicas. Foram observados, independentemente do modo de fornecimento - via solo ou foliar - acúmulo de Se nos grãos e na parte aérea, incrementos nos teores de carboidratos e nas atividades da catalase e peroxidase do ascorbato. Além disso, todos os tratamentos via solo promoveram incrementos nas leituras SPAD. O Se proporcionou efeito benéfico às plantas de trigo resultando em maior acúmulo de biomassa da parte aérea e, nas plantas submetidas às adubações via folha com 21 e 120 g ha⁻¹ de Se foi observado maior produtividade dos grãos. Além disso, o tratamento com 21 g ha⁻¹ de Se via folha promoveu incrementos na fotossíntese líquida e no teor de nitrogênio total. Ambas as vias de fornecimento do Se são eficientes para a biofortificação agronômica do trigo em campo.

Palavras-chave: Elemento benéfico. *Triticum aestivum*. Campo. Selenato.

GENERAL ABSTRACT

Selenium is an element essential to humans and animals. The deficiency of this mineral occurs in more than one billion people. Biofortification is an efficient strategy for countering this deficiency. In addition, selenium is, possibly, beneficial to plants. Thus, the present study aims at seeking information and alternatives for the biofortification of wheat with Se in the field, in addition to proving its beneficial effect to plants, and the reasons leading to the higher production and accumulation of biomass. Wheat plants were treated with different concentrations of Se (12, 21, 38, 68 and 120 g Se ha⁻¹), using selenate as source. We conducted two studies. In the first, we provided Se via root. In the second, we provided Se via leaves, divided into two application of equal concentrations. In both studies, biochemical and physiological analyses were conducted. It was observed that, regardless of the means of provision – via soil or leaf -, there was accumulation of Se in grains and shoot, increment in the contents of carbohydrates, and in the activities of catalase and ascorbate peroxidase. In addition, all treatments via soil promoted increments in the SPAD readings. Se caused beneficial effects to wheat plants, resulting in a higher accumulation of shoot biomass and, in plants submitted to fertilization via leaf, with 21 and 120 g ha⁻¹ of Se, occurred higher production. The treatment with 21 g ha⁻¹ of Se via leaf promoted the increment of liquid photosynthesis and of the content of total nitrogen. Both means of Se provision are efficient for the biofortification of wheat in the field.

Keywords: Beneficial element. *Triticum aestivum*. Field. Selenate.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	11
1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	Benefícios do selênio aos humanos	14
2.2	Selênio nas plantas e no solo	16
2.2.1	Influência do Se sobre o metabolismo dos carboidratos	20
2.2.2	Influência do Se sobre o metabolismo do nitrogênio	22
2.2.3	Influência do selênio sobre o metabolismo antioxidativo	24
2.3	O trigo	27
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	29
	REFERÊNCIAS	31
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	43
	ARTIGO 1 - BIOFORTIFICAÇÃO AGRONÔMICA DO TRIGO COM SELÊNIO VIA FOLHA	43
1	INTRODUÇÃO	47
2	MATERIAL E MÉTODOS	49
2.1	Instalação do experimento	49
2.2	Análises fisiológicas e agronômicas	51
2.2.1	Quantificação da biomassa da parte aérea e dos teores de carboidratos, proteínas e aminoácidos totais	51
2.2.2	Análises de selênio (Se) e enxofre (S) na parte aérea e nos grãos	52
2.2.3	Produtividade de grãos	52
2.2.4	Enzimas invertase neutra do citosol (INC) e invertase ácida do vacúolo (IAV)	53
2.2.5	Enzima invertase ácida da parede (IAP)	53
2.2.6	Trocas gasosas	54
2.2.7	Leituras com o SPAD	54
2.2.8	Análise do teor de nitrogênio total na parte aérea	54
2.2.9	Enzimas antioxidantes	54
2.2.9.1	Dismutase do superóxido (SOD)	55
2.2.9.2	Catalase (CAT)	55
2.2.9.3	Peroxidase do ascorbato (APX)	56
2.2.9.4	Redutase do dehidroascorbato (DHAR)	56
2.2.9.5	Redutase da glutatona (GR)	56
2.2.10	Peróxido de hidrogênio (H₂O₂)	56
2.2.11	Peroxidação lipídica (MDA)	57
2.3	Análise estatística	57
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59

3.1	Teores de selênio (Se) e enxofre (S) nas folhas e nos grãos.....	59
3.2	Produtividade Agronômica	62
3.3	Metabolismo antioxidativo	65
3.4	Metabolismo do nitrogênio.....	67
3.5	Metabolismo de carboidratos e taxa fotossintética líquida	69
4	CONCLUSÃO	75
	REFERÊNCIAS	77
	ARTIGO 2 - METABOLISMO DE CARBOIDRATOS E SISTEMA ANTIOXIDANTE EM PLANTAS DE TRIGO BIOFORTIFICADAS COM SELÊNIO APLICADO VIA SOLO.....	83
1	INTRODUÇÃO	87
2	MATERIAL E MÉTODOS	89
2.1	Instalação do experimento	89
2.2	Análises agronômicas e fisiológicas.....	90
2.2.1	Quantificação da biomassa da parte aérea e dos teores de carboidratos, proteínas e aminoácidos totais.....	91
2.2.2	Leituras com o SPAD	91
2.2.3	Análises de selênio (Se) e enxofre (S) na parte aérea e nos grãos.....	91
2.2.4	Análise do teor de nitrogênio total na parte aérea	92
2.2.5	Produtividade de grãos	92
2.2.6	Enzimas antioxidantes.....	92
2.2.6.1	Dismutase do superóxido (SOD)	93
2.2.6.2	Catalase (CAT).....	93
2.2.6.3	Peroxidase do ascorbato (APX)	94
2.2.7	Peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	94
2.2.8	Peroxidação lipídica (MDA).....	95
2.2.9	Enzimas invertase neutra do citosol (INC) e invertase ácida do vacúolo (IAV)	95
2.2.10	Enzima invertase ácida da parede (IAP)	96
2.3	Análise estatística	96
3	RESULTADOS e DISCUSSÃO	97
3.1	Teor de selênio (Se) e enxofre (S) nas folhas e nos grãos de trigo.....	97
3.2	Produtividade Agronômica	101
3.3	Metabolismo dos Carboidratos	102
3.4	Metabolismo antioxidante	105
3.5	Metabolismo do nitrogênio.....	108
3.6	Leitura SPAD	109
4	CONCLUSÃO	111
	REFERÊNCIAS	113

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Mais de um bilhão de pessoas não ingerem alimentos suficientes para suprir suas necessidades diárias básicas de energia. Uma população maior, aproximadamente de três bilhões de pessoas, possui deficiência de micronutrientes por não terem condições financeiras para comprar carne vermelha, frango, peixe, frutas, legumes e hortaliças nas quantidades necessárias. No entanto, através da biofortificação (genética e, ou, agrônômica), o número de pessoas que sofrem com desnutrição pode ser reduzido em um período relativamente curto e de forma sustentável para os produtores. As seis principais culturas básicas da alimentação humana (feijão, mandioca, milho, arroz, batata-doce e trigo) estão sendo estudadas com o objetivo de gerar tecnologias e conhecimentos para o desenvolvimento de novas cultivares e com melhor qualidade proteica, além de maiores teores de ferro, zinco e selênio (Se).

O Se é componente de vinte e cinco selenoproteínas envolvidas no metabolismo antioxidativo, na manutenção do estado imunológico, na produção do hormônio tireoidiano e em funções anti-inflamatórias (RAYMAN, 2012). Além dos benefícios aos humanos e animais, o Se é um elemento benéfico às plantas, pois possibilita uma maior eficiência do sistema antioxidante, aumenta a assimilação do nitrogênio e os teores de carboidratos, podendo resultar em maior produção e acúmulo de biomassa pelos vegetais (PILON-SMITS et al., 2010). Desta forma, a técnica de biofortificação de plantas com Se proporciona múltiplos benefícios tanto para as plantas, como para os animais ou homens que se alimentam de plantas biofortificadas.

No entanto, apesar da importância do Se, sua deficiência atinge aproximadamente um bilhão de pessoas no mundo, principalmente nos países em desenvolvimento, onde os cereais são a base da alimentação. Os teores de Se

nos cereais e produtos originados destes são baixos, entre 10 e 550 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (FAO/WHO, 2001). O trigo é amplamente utilizado na alimentação humana, para a produção de pães, farinhas, massas e bolos. Logo, estudos com o objetivo de melhorar a qualidade desses produtos através da biofortificação com Se são de total relevância para a população. Em estudos com trigo, Adams et al. (2002) observaram, em condições naturais de campo (sem adubação com Se), variação nos teores de selênio entre 6 e 858 $\mu\text{g Se kg}^{-1}$ peso seco de grão. Já, Lyons et al. (2005) observaram, em campo, após o tratamento com 120 g ha^{-1} de Se, teores de 11.950 $\mu\text{g Se kg}^{-1}$ peso seco de grão, o que demonstra a capacidade do trigo em acumular Se nos grãos.

O Se em concentrações adequadas é benéfico aos vegetais, uma vez que, aumenta a atividade do sistema antioxidante enzimático e não enzimático, auxilia em uma maior assimilação de nitrogênio, além de tornar o metabolismo dos carboidratos mais ativo, em virtude do aumento na taxa fotossintética, do fotossistema mais eficiente e incremento na atividade das enzimas. Esses efeitos benéficos necessitam serem comprovados no trigo cultivado em campo.

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é o segundo cereal mais cultivado mundialmente, sendo a produção mundial de 705 milhões de toneladas para a safra 2015/2016. No Brasil, a produção da safra 2015 foi estimada em 6,6 milhões de toneladas, 11,4% maior do que a safra anterior. A região Sul é a principal produtora de trigo com 91,55%, seguida pela região Sudeste com 7,15%, e a região Centro-Oeste com 1,30% (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2016).

A técnica de biofortificação agrônômica (via suprimento solo ou foliar de Se às plantas) é uma estratégia interessante no combate à deficiência nutricional, ao passo que a suplementação com sais inorgânicos apresentam baixa eficiência. Além disso, o nutriente disponibilizado ao vegetal pode aumentar a produção. No entanto, são escassos os trabalhos realizados em

campo com o intuito de avaliar concomitantemente a eficiência da técnica em promover o acúmulo de Se com os benefícios gerados aos vegetais. Assim sendo, o presente trabalho teve como objetivos: i) comparar alternativas (via folha e solo) e doses para a biofortificação agronômica do trigo com Se em campo, visando seu uso na alimentação humana; e ii) avaliar o Se como elemento benéfico para os vegetais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Benefícios do selênio aos humanos

O Se é um elemento essencial para os seres humanos e animais, pois é componente de 25 selenoproteínas envolvidas na proteção contra o estresse oxidativo, manutenção do estado redox e imunológico (REEVES; HOFFMANN, 2009). As selenoproteínas também influenciam a produção do hormônio tireoidiano, e apresentam funções anti-inflamatórias (RAYMAN, 2012), apresentado ainda benefícios em: síntese de DNA, auxiliando a prevenção do câncer, na fertilidade, reprodução e recuperação muscular (PEDRERO; MADRID, 2009). Além disso, há evidências de que a doença de Alzheimer tem uma estreita relação com a deficiência em Se nos humanos (CARDOSO et al., 2010).

Dessa forma, a ingestão diária de Se é fundamental para manter o funcionamento fisiológico do corpo humano. No entanto, mais de um bilhão de pessoas no mundo são deficientes em Se (MORA et al., 2015). As recomendações diárias de ingestão de Se para as crianças na faixa etária de 1 a 4 anos, de 4 a 7 anos e de 7 a 10 são $15 \mu\text{g dia}^{-1}$, $20 \mu\text{g dia}^{-1}$ e $30 \mu\text{g dia}^{-1}$, respectivamente. Para os adolescentes na faixa etária de 10 a 13 anos e 13 a 15 anos são $45 \mu\text{g dia}^{-1}$ e $60 \mu\text{g dia}^{-1}$, respectivamente. Para as mulheres (maiores de 15 anos), $60 \mu\text{g dia}^{-1}$, para os homens (maiores de 15 anos), $70 \mu\text{g dia}^{-1}$; para as mulheres grávidas, $60 \mu\text{g dia}^{-1}$ e durante a lactação $75 \mu\text{g dia}^{-1}$ (KIPP et al., 2015; RAYMAN, 2004). A ingestão máxima tolerável de Se para adultos é de $300 \mu\text{g dia}^{-1}$; crianças de 1 a 3 anos, $60 \mu\text{g dia}^{-1}$ e crianças de 15 a 17 anos, $250 \mu\text{g dia}^{-1}$ (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY - EFSA, 2014). No entanto, a ingestão de selênio necessária para otimizar a atividade das peroxidases da glutathione (GPx4) e proporcionar a concentração ideal de

selenoproteína P (SEPP1) é aproximadamente $75 \mu\text{g dia}^{-1}$ para humanos (XIA et al., 2010).

A ingestão diária de Se no mundo varia entre 7 e $4.990 \mu\text{g dia}^{-1}$ com média na Europa de $40 \mu\text{g dia}^{-1}$, nos Estados Unidos, para mulheres, de $93 \mu\text{g dia}^{-1}$ e para homens, de $134 \mu\text{g dia}^{-1}$ (FAIRWEATHER-TAIT et al., 2011; RAYMAN, 2008). Essa variação também ocorre no Brasil (LEMIRE et al., 2006, 2010; SANTOS et al., 2014a, 2014b). Em estudo com crianças entre 3 e 7 anos de idade, nas cidades brasileiras de São Paulo, Macapá e Belém, foi constatado que a ingestão diária de Se é adequada, sendo superior a $25 \mu\text{g dia}^{-1}$ que é o indicado para a faixa etária de estudo (NRC, 2000), porém difere entre $37,4 (\pm 16,0) \mu\text{g dia}^{-1}$ observado em São Paulo a $107 (\pm 107) \mu\text{g dia}^{-1}$ observado em Belém (MAIHARA et al., 2004).

Existe muita divergência no meio acadêmico, sobre qual é a concentração de Se no plasma sanguíneo indicado aos humanos. De acordo com a Prevenção Nutricional de Câncer (NPC) dos Estados Unidos, concentrações acima de $122 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se no plasma sanguíneo representam riscos à saúde, pela maior incidência de câncer, câncer de pele não melanoma e diabetes do tipo 2. Porém, Bleys et al. (2007) constataram que, a taxa de Se no plasma sanguíneo entre 130 e $150 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se representa a taxa mínima de mortalidade de adultos Norte Americanos com problemas vasculares e com câncer. Dessa forma, mais estudos são necessários para se chegar a um consenso sobre a concentração ideal de Se no plasma sanguíneo.

Estudos realizados no Brasil, com o intuito de avaliar a concentração Se no plasma sanguíneo, relatam grande variação em indivíduos de diferentes Estados. Em indivíduos do estado do Ceará, reportou-se uma concentração média de $62,6 \pm 8,5 \mu\text{g L}^{-1}$ (SANTOS et al., 2014a). Já, em comunidades do Baixo Tapajós, a concentração média observada foi de $291,8 \mu\text{g L}^{-1}$, porém com grande variação entre os indivíduos, na comunidade do Santo Antônio estes

apresentaram média de $1.078 \mu\text{g L}^{-1}$ (variando de 558 a $1.500 \mu\text{g L}^{-1}$), enquanto que, indivíduos da comunidade do Ipaupixuna apresentaram média de $208 \mu\text{g L}^{-1}$ (variando de 135 a $356 \mu\text{g L}^{-1}$). Essas variações foram atribuídas aos consumos regulares de castanha-do-pará, galinha doméstica e carnes de caça (LEMIRE et al., 2010). Enfim, a variação da ingestão diária de Se está relacionada com vários fatores, tais como a espécie do vegetal ingerido, o tipo de alimento, modo de preparo e cozimento do alimento, além do solo em que o vegetal se desenvolveu (RAYMAN, 2008).

A variação de Se encontrado nos solos mundiais está entre 0,005 e 8.000 mg kg^{-1} (MORA et al., 2015). Além disso, existem outros fatores que determinam a disponibilidade do selênio no solo, como especiação do selênio (selenato e selenito), pH, textura e teor de matéria orgânica do solo (SPADONI et al., 2007).

2.2 Selênio nas plantas e no solo

Os cereais são à base da alimentação de populações que vivem em regiões subdesenvolvidas. Estes apresentam baixas concentrações de minerais, e, com isso, as populações ficam vulneráveis à deficiência. Os cereais e produtos originados dos destes contribuem com cerca de 70% da ingestão alimentar de Se da população que vive nas áreas com solo pobre em Se na China, e com 40 a 54% da população de baixa renda na Índia (FAO/WHO, 2001). As concentrações de Se nos cereais apresentam variações, entre 10 e $550 \mu\text{g kg}^{-1}$ em base de peso fresco (FAO/WHO, 2001). A baixa ingestão de micronutrientes pode ser revertida com a diversificação da alimentação, suplementação com Se e pelo consumo de alimentos biofortificados (HAWKESFORD; ZHAO, 2007).

A técnica de biofortificação se baseia no pressuposto que os teores de Se nos grãos estão diretamente relacionados com sua disponibilidade no meio (DURÁN et al., 2013). Sendo assim, a biofortificação agrônômica consiste em

aumentar os teores dos elementos nos vegetais, através de sua disponibilização na forma de adubos fornecidos via solo ou foliar, já a biofortificação genética consiste em selecionar espécies que acumulam grande quantidade de Se e/ou a introdução de genes que proporcione o maior desses minerais (CHEN et al., 2009; BROADLEY et al., 2010). A biofortificação permite elevar os teores de Se a níveis satisfatórios em curto prazo nos vegetais e conseqüentemente, nos animais que deles se alimentam (HAWKESFORD; ZHAO, 2007). Estudos sobre a biofortificação em cereais, e principalmente em trigo, demonstram ser esta uma técnica muito promissora para melhorar o estatus nutricional de vegetais e animais (GALINHA et al., 2015).

A concentração de Se no solo é altamente variável de $0,005 \text{ mg kg}^{-1}$ em áreas da China e Finlândia, a 8.000 mg kg^{-1} em solos seleníferos da Rússia (MORA et al., 2015) Os solos do Estado de São Paulo apresentam teores $< 0,08$ a $1,61 \text{ mg kg}^{-1}$, com a média de $0,19 \text{ mg kg}^{-1}$ (GABOS; ALLEONI; ABREU, 2014), enquanto os solos do Cerrado brasileiro apresentam teores entre $0,022$ e $0,081 \text{ mg kg}^{-1}$ (CARVALHO, 2011). Os solos são considerados deficientes em Se quando apresentam concentrações menores que $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ de solo seco (MILLAR, 1983). As baixas concentrações de Se nos solos podem resultar em baixos níveis nas plantas e, conseqüentemente, baixa ingestão de Se pelos humanos e animais que se alimentam dessas plantas (DURÁN et al., 2013). Com a inserção do Se na nutrição das plantas, ocorreram múltiplos benefícios, primeiramente para as plantas e posteriormente aos humanos e animais que as consumirem (BROADLEY et al., 2010).

O Se é um elemento benéfico às plantas, e, quando disponível em concentrações corretas auxilia no crescimento e atenua os efeitos dos estresses bióticos ou abióticos, devido o sistema antioxidante mais ativo (PILON-SMITS et al., 2010). No entanto, o excesso de Se pode ser prejudicial e causar toxicidade, e o limite que separa os efeitos benéficos da toxicidade é estreito.

As principais formas de Se encontradas no solo são o selenato (SeO_4^{2-}) e selenito (SeO_3^{2-}). O selenato é a forma predominante em solos alcalinos e bem-oxidado, e o selenito é a forma predominante em solos bem drenados, com pH de ácido para neutro (ELRASHIDI et al., 1987; HAWRYLAK-NOWAK et al., 2015). Além disso, o selenato é a forma mais prevalente de Se biodisponível em solos agrícolas, sendo mais solúvel em água do que o selenito, ao passo que, o selenito é mais fortemente adsorvido do que o selenato (BARROW; WHELAN, 1989; MISSANA et al., 2009; SORS et al., 2005).

Existem diferenças marcantes na absorção, translocação e metabolismo do Se, quando este é proveniente de fontes diferentes (LONGCHAMP et al., 2015). O selenato é absorvido pelas raízes através dos transportadores de sulfato de alta afinidade (WHITE et al., 2004). Por outro lado, o selenito é absorvido pelas raízes através de transportadores de fosfato (LI; MCGRATH; ZHAO, 2008). O selenato e o selenito também diferem na sua mobilidade dentro das plantas, enquanto o selenato é facilmente translocado a partir de raízes para a parte aérea, e o selenito, ou os seus produtos metabólicos, tende a se acumular nas raízes (LONGCHAMP et al., 2015). A rápida assimilação do selenito, em forma de selenoaminoácidos (principalmente selenometionina, selenocisteína e selenometil selenocisteína) pode causar fitotoxicidade, mesmo sob baixas concentrações de selenito (GALINHA et al., 2015; PEDRERO; MADRID, 2009). Desta forma, a maior facilidade do selenato ser translocado nos vasos condutores e sua menor toxidez, justifica sua utilização para a biofortificação em detrimento ao selenito (GUPTA; WATKINSON, 1985; KAUR et al., 2014; SIMA; GISSEL-NIELSEN, 1985).

As plantas podem ser classificadas como não acumuladoras de Se, e, neste caso, apresentam concentrações inferiores a 25 mg kg^{-1} de Se no peso seco em seu ambiente natural e não toleram elevadas concentrações de Se (WHITE et al., 2004). Por outro lado, algumas espécies dos gêneros *Stanleya* (Brassicaceae)

e *Astragalus* (Fabaceae) podem hiperacumular Se em concentrações de 1.000 a 15.000 mg kg⁻¹ de Se no peso seco da parte aérea, mesmo crescendo em solos contendo apenas de 2 a 10 mg kg⁻¹ de Se (GALEAS et al., 2008; MEHDAWI et al., 2014). Plantas de trigo são consideradas não acumuladoras de Se, porém, quando submetidas às doses com 32 mg kg⁻¹ de Se podem apresentar concentrações de até 1.745 mg kg⁻¹ de Se nas folhas jovens, no entanto concentrações acima de 60 mg kg⁻¹ Se nas folhas jovens causa toxicidade (LYONS et al., 2005).

As semelhanças químicas do selênio (Se) e enxofre (S) conferem a ambos, vias de assimilação semelhante (FREEMAN et al., 2010; SORS et al., 2005). Uma vez absorvido pela planta, o selenato é transportado para os cloroplastos, onde é processado pela via de assimilação do enxofre (HAWKESFORD, 2005). Primeiramente, o selenato é ativado pela ATP sulfúrilase, formando a adenosina-5-fosfoselenato (APSe) (PILON-SMITS et al., 2010). A APSe é reduzida a selenito pela redutase da adenosina-5-fosfossulfato (APS). O selenito é reduzido a seleneto pela glutatona, através de redução não enzimática (FREEMAN et al., 2010; MEHDI et al., 2013). O seleneto, por sua vez, é incorporado aos aminoácidos resultando na produção de selenoaminoácidos, tais como: selenocisteína e selenometionina (ELLIS; SALT, 2003; FREEMAN et al., 2010). Estes dois aminoácidos podem ser incorporados a proteínas, o que pode levar à inativação das proteínas e causar toxicidade nas plantas (STADTMAN, 1996; MEHDAWI et al., 2014). Por outro lado, a maior atividade das enzimas do metabolismo dos aminoácidos, pode promover a maior absorção e assimilação de nitrogênio (RIOS et al., 2010).

A capacidade das plantas em acumular grande quantidade de Se está relacionada com a atividade da enzima selenometiltransferase (SMT) (FREEMAN et al., 2010). Esta enzima produz a metilselenocisteína (MeSeCys) a partir da metilação da metilcisteína (SeCys), usando a S-metilmetionina como

o doador do grupo metil (NEUHIER et al., 1999). A metilação da SeCys impede a incorporação da selenocisteína às proteínas não específicas, o que ajuda a conferir tolerância a *Astragalus bisulcatus* ao Se (WANG et al., 1999). Porém, o gene que codifica a SMT foi superexpresso em *Arabidopsis thaliana* e *Brassica juncea* levando a uma maior tolerância e acúmulo de Se quando as plantas foram cultivadas na presença de selenito, mas não quando cultivadas com selenato (ELLIS et al., 2004; LEDUC et al., 2004). De acordo com Freeman et al. (2010), a SMT é uma enzima importante na hiperacumulação e tolerância, porém, possíveis processos adicionais estão atuando sinergicamente sobre a hiperacumulação de Se.

Trabalhos recentes têm demonstrado que o fornecimento de Se às plantas promove múltiplos benefícios (NAWAZ et al., 20015; SIEPRAWSKA et al., 2015). Esses trabalhos sinalizam para uma maior influência do Se sobre o sistema antioxidante e os metabolismos do nitrogênio e de carboidratos (HAJIBOLAND; SADEGHZADE, 2014, NAWAZ et al., 2014). A seguir, serão detalhados os possíveis mecanismos que confere tais benefícios.

2.2.1 Influência do Se sobre o metabolismo dos carboidratos

Os carboidratos são sintetizados pelas folhas através da fotossíntese e são translocados para os tecidos drenos, principalmente na forma de dissacarídeos, como a sacarose. Nos drenos, a sacarose é clivada em monossacarídeos, glicose e frutose. A sacarose é a molécula mais utilizada na translocação do carboidrato, metabolismo energético e sinalização das plantas superiores. Além disso, o carboidrato pode ser armazenado nas formas de sacarose e principalmente, amido (ROITSCH; GONZALEZ, 2004). O carboidrato, além de ser o principal substrato para a respiração de crescimento e manutenção, faz parte de um complexo sistema de sinalização (SAIRANEN et al., 2012). A abundância e a escassez de carboidratos podem aumentar ou

diminuir a expressão de determinados genes (KOCH, 1996), que levam à expressão da auxina (fitohormônio relacionado ao crescimento em comprimento vertical dos vegetais) (SAIRANEN et al., 2012), de frutanos (polissacarídeo de reserva) e antocianinas (pigmento fotoprotetor) (ENDE; ESAWE, 2014), além de atuar no metabolismo antioxidante (KEUNEN et al., 2013). A invertase é a enzima que realiza a clivagem hidrolítica da sacarose em monômeros de hexoses. As plantas possuem três tipos de invertases, que são localizadas no apoplasto (invertase ácida da parede), no citoplasma (invertase neutral do citosol) e no vacúolo (invertase ácida do vacúolo) (ROITSCH; GONZALEZ, 2004). A invertase ácida da parede está relacionada com o descarregamento do floema, enquanto que a invertase neutral do citosol é mais ativa na fase inicial da glicólise, e a invertase ácida do vacúolo é facilmente encontrada em órgão ou organelas que estocam carboidratos de reserva, como o amido (ROITSCH; GONZALEZ, 2004).

O aumento no crescimento das plantas na presença de Se, frequentemente está associado ao aumento na taxa fotossintética líquida (A) em condições ideais (HAJIBOLAND; SADEGHZADE, 2014; OWUSU-SEKYERE et al., 2013; ZHANG et al., 2014), e em condições de estresses abióticos (DIAO et al., 2014; NAWAZ et al., 2014; SIEPRAWSKA et al., 2015), em função do aumento no fornecimento de energia e esqueletos carbono extras (HAJIBOLAND; SADEGHZADE, 2014).

O aumento da A é controlado por mecanismos estomáticos (por exemplo: abertura e fechamento) e mecanismos não estomáticos (por exemplo: atividade enzimática e funcionamento do PSII). Plantas sobre estresses abióticos, como o déficit hídrico, provavelmente, têm menores taxas A , devido ao fechamento estomático e ao mau funcionamento do PSII. Plantas de tomate submetidas ao estresse salino diminuíram o rendimento quântico máximo do PSII (F_v/F_m), a eficiência fotoquímica aparente do PSII (Φ PSII) (capacidade de

conversão da energia da luz, primária e real) e o coeficiente de *quenching* fotoquímica (P_q) (estado reduzido do acceptor primário de elétrons QA), sugerindo que a salinidade induz a inibição do transporte de elétrons no PSII e a redução da atividade fotoquímica do PSII (DIAO et al., 2014). No entanto, os valores de F_v/F_m , Φ_{PSII} e P_q foram maiores quando as plantas submetidas ao estresse salino foram tratadas com Se, indicando que o Se pode amenizar, os efeitos maléficos do estresse salino (DIAO et al., 2014). Além disso, neste mesmo experimento, Diao et al. (2014) observaram que o Se aumentou o conteúdo de glutathiona reduzida (GSH), ascorbato (AsA), e as razões de GSH/glutathiona dissulfeto (GSSG), AsA/dehidroascorbato (DHA) e NADPH/NADP⁺ nos cloroplastos das plantas de tomate, reduzindo o efeito do estresse salino e mantendo a integridade das membranas celulares.

Em condições ideais, os efeitos do Se sob as plantas são mais significativos, uma vez que todo o processo fotossintético é otimizado. Em estudos com plantas tratadas com Se, houve incrementos nos conteúdos dos carboidratos (amido, sacarose e açúcares redutores), nas atividades das enzimas α -amilase, invertase, sintase da sacarose, sintase da sacarose fosfato e frutose-1,6-bifosfatase, na A, nos pigmentos fotossintetizantes e na condutância estomática. Além disso, observaram melhorias nos parâmetros de fluorescência F_v/F_m , Φ_{PSII} e taxa de transporte de elétrons (CHEN et al., 2008; HAJIBOLAND; SADEGHZADE, 2014; MALIK et al., 2012; NAWAZ et al., 2014; OWUSU-SEKYERE et al., 2013; SIEPRAWSKA et al., 2015; ZHANG et al., 2014).

2.2.2 Influência do Se sobre o metabolismo do nitrogênio

O Se influencia vários processos no crescimento e desenvolvimento das plantas. Neste sentido, torna-se de grande relevância a realização de pesquisas para se avaliar o efeito do Se sobre a nutrição mineral dos vegetais,

principalmente, na assimilação de nitrogênio (N), pois se trata do nutriente mais requisitado pelas plantas, sendo necessário em concentrações de 2% a 5% na matéria seca, para o funcionamento metabólico normal da planta (MILLER; CRAMER, 2005). O N é um elemento essencial para as plantas, pois está presente na composição das proteínas e clorofilas. Dessa forma, o conteúdo limitado de compostos nitrogenados pode ser o fator limitante para o crescimento das plantas, ou seja, uma maior assimilação ou otimização do metabolismo de N, o qual possivelmente, reflete em um maior crescimento (NUNES-NESI et al., 2010; HAJIBOLAND et al., 2014).

Estudos comprovaram que o uso de doses e fontes corretas de Se podem aumentar o conteúdo de aminoácidos e proteínas nas plantas (RIOS et al., 2010). Isso é devido a uma maior taxa de assimilação de N, em função de uma maior atividade das enzimas da rota de assimilação do N: redutase do nitrato (RN), glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT) (DJANAGUIRAMAN et al., 2004; HAJIBOLAND et al., 2014; HAJIBOLAND; KEIVANFAR, 2011; RIOS et al., 2010; XU et al., 2013). A maior atividade das enzimas da rota de assimilação do N, em concentrações iguais de N, pode significar que as plantas aumentaram a eficiência do uso do nitrogênio, quando o Se foi aplicado, ou seja, elas produziram mais compostos nitrogenados com os mesmos teores de N. Possivelmente, a eficiência está ligado à maior intensificação do metabolismo de enxofre (S), quando o Se é aplicado nestas plantas. O Se, em baixas doses, aumenta a absorção do S por sinergismo (RAMOS et al., 2011a), e isto estimula o metabolismo do N, uma vez que, tem que se manter o equilíbrio adequado entre compostos orgânicos nitrogenados e os sulfatos (GERENDAS et al., 2008; RIOS et al., 2008, 2010).

Os aminoácidos formados por plantas acumuladoras e não acumuladoras de Se apresentam diferentes perfis. Plantas acumuladoras utilizam-se da estratégia de acumular Se em aminoácidos não proteicos para evitar a toxicidade

do Se, enquanto que plantas não acumuladora não possuem esta capacidade (WHANGER, 2002). Ávila et al. (2014) observaram, em plantas de *Brassica* (acumuladoras de Se) biofortificadas com Se, um acúmulo de cerca de 50% do Se na forma de Se-metilselenocisteína (SeMeSeCys), enquanto que nos cereais, o Se é encontrado, principalmente na forma de SeMet (GALINHA et al., 2015). Já, Ježek et al. (2011) observaram que, com a aplicação foliar de Se em batata (não acumuladora de Se), houve aumento nos teores relativos de aminoácidos totais essenciais e não essenciais em relação ao tratamento controle (sem aplicação de Se). Os aminoácidos que obtiveram aumentos mais significativos foram: fenilalanina, ácido aspártico, ácido glutâmico, treonina e tirosina.

2.2.3 Influência do selênio sobre o metabolismo antioxidativo

Normalmente as espécies reativas de oxigênio (EROs) funcionam como sinalizadoras para resposta ao estresse. No entanto, com aumento na duração e intensidade do estresse, ocorre um aumento nas EROs e, quando a defesa antioxidante não é suficiente para neutralizá-las, há o estresse oxidativo. Em caso de estresse oxidativo, há o rompimento da homeostase celular e o ataque a componentes celulares como os lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos. As principais EROs incluem o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^{\cdot}) e oxigênio singlete (1O_2). Geralmente, dois grupos de antioxidantes são mais presentes nas plantas. O primeiro compreende substâncias de baixo peso molecular, tais como a glutathiona reduzida (GSH), ascorbato (AsA) e tocoferol, que são compostos não enzimáticos. O segundo grupo de antioxidante são as enzimas como a dismutase do íon superóxido (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), peroxidase da glutathiona (GSH-Px), peroxidase do guaiacol (GPOX) e redutase da glutathiona (GR) (SUZUKI et al., 2012).

A primeira enzima a atuar no ciclo do sistema antioxidante, em muitos casos, é a SOD que, atua dismutando o superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual pode ser convertido em água e oxigênio pela CAT (KIBINZA et al., 2011). No ciclo ascorbato (ASA) – glutatona (GR), a APX converte o H_2O_2 em água, com o AsA como doador de elétrons (ZHANG et al., 2008). A dehidroascorbato redutase (DHAR) utiliza os elétrons fornecidos pela glutatona reduzida (GSH) para reduzir o dehidroascorbato (DHA) em AsA, enquanto que o DHA é previamente produzido a partir do monodehidroascorbato (MDHA). Simultaneamente, GSH é oxidada em glutatona dissulfeto (GSSG) pela DHAR, e a GSSG é então reduzida em GSH, pela ação da GR (GILL; TUTEJA, 2010).

O Se controla a produção e a eliminação das EROs em plantas, atuando diretamente como antioxidante através de moléculas que contém Se em suas estruturas (compostos de Se) ou, indiretamente, através da regulação dos antioxidantes, evitando os efeitos danosos das EROs sobre as plantas (Feng et al., 2013). Diversos autores comprovaram os efeitos benéficos do Se na manutenção da homeostase celular, com destaque para os estudos de Kumar et al. (2012), na presença de Cd; Djanaguiraman et al. (2010) e Hasanuzzaman et al. (2014), durante a exposição a altas temperaturas; Yao et al. (2011), em radiação UV-B; Chu et al. (2010), em baixa temperatura, além de Hasanuzzaman, Hossain e Fujita (2011) e Nawaz et al. (2014), em estresse hídrico. Além disso, em outros estudos foram observados a diminuição do estresse oxidativo, possivelmente, em virtude de, uma maior atividade enzimática, mesmo sob condições ideais de cultivo (RAMOS et al., 2011a, 2011b).

Segundo Feng e Wei (2012), possivelmente, são três os mecanismos que diminuem o nível de $O_2^{\cdot-}$ nos vegetais, quando na presença de Se em concentrações corretas. Primeiro, a dismutação espontânea de $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 (sem

a catálise da enzima SOD) (CARTES et al., 2010; HARTIKAINEN; XUE; PIIRONE, 2000). Segundo, compostos de Se podem atuar diretamente na extinção de $O_2^{\cdot-}$ e OH^{\cdot} . Terceiro, através da regulação das enzimas antioxidantes (por exemplo, SOD) (FENG; WEI; TU, 2013; XUE et al., 1993;). A eliminação do H_2O_2 , o Se atua ativando enzimas antioxidantes (por exemplo, GSH-Px), principalmente, em condições de estresse (FILEK et al., 2008; KUMAR et al., 2012).

O Se também pode atuar diretamente e de forma diferente nos antioxidantes. Acredita-se que a GSH-Px seja uma enzima chave neste processo, por ser ativada de forma robusta e amplamente pelo Se em várias plantas expostas a diversos estresses (FENG; WEI; TU, 2013). A atividade da SOD pode ser influenciada em plantas expostas ao Se, em função do grau de estresse oxidativo da planta, doses de Se e estágio de desenvolvimento, ou seja, em níveis maiores de estresse oxidativo, estágios de desenvolvimento avançado e altas doses de Se a atividade da SOD, aparentemente, será maior (CARTES et al., 2010; HARTIKAINEN; XUE; PIIRONEN, 2000). As enzimas APX e CAT aumentaram suas atividades na presença do Se em condições de estresse (HASANUZZAMAN et al., 2011; MALIK et al., 2012) e em condições ideais (RAMOS et al., 2011a, 2011b).

O Se também aumenta a atividade do ciclo GSH-ASC através do incremento nos níveis de GSH e AsA, além de aumentar a atividade das enzimas APX, DHAR, MDAR, GR, GPX (FENG; WEI, 2012; HASANUZZAMAN; FUJITA, 2011; WANG et al., 2011). Na presença do Se, o conteúdo de GSH pode aumentar, pois a GSH é utilizada na via de assimilação do Se para formar os aminoácidos SeCys e SeMet. Dessa forma, com o aumento de um componente do ciclo, todo o ciclo sofre influência (FENG; WEI; TU, 2013; TERRY et al., 2000).

O conteúdo de EROs regula vários processos biológicos, entre eles a senescência, etapa do biociclo vegetal e pode ser regulada por fatores ambientais e autônomos. Este processo é caracterizado pelo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, que culmina com a deterioração das organelas e termina com a morte do órgão (KAUR et al., 2014).

A capacidade do Se em atrasar o estresse oxidativo decorrente da senescência foi avaliado em alfaca por Djanaguiraman et al. (2005). Estes autores observaram que, em baixa dose, o Se estimulou o crescimento de mudas senescentes (aumentou 14% a matéria seca), possivelmente, devido ao maior aumento na atividade das enzimas antioxidantes GSH-Px e SOD e dos conteúdos de clorofila a, b e total, comparando ao controle.

2.3 O trigo

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é amplamente utilizado na alimentação humana para a produção de pães, farinhas, massas, bolos (LYONS; STANGOULIS; GRAHAM, 2003), o que o torna uma espécie muito requisitada. O trigo é originário de regiões montanhosas do Sudoeste da Ásia (Irã, Iraque e Turquia), tendo sido introduzido na Europa durante a pré-história. O trigo pertence à família das Poaceae, é uma espécie autógama e normalmente, apresenta baixa frequência de polinização cruzada. Atualmente, se cultivam trigo de inverno e de primavera. O trigo de inverno, em seu estágio inicial de desenvolvimento, necessita passar por um período de vernalização, para completar o ciclo reprodutivo. O trigo cultivado no Brasil é de hábito primaveril e a maioria das cultivares é insensível ao fotoperíodo (ABITRIGO, [2016?]). Esse cereal é o segundo mais cultivado mundialmente (BRASIL, [201-]) a produção da safra de 2015/2016 foi, de 705 milhões de toneladas (Conselho Internacional de Grãos). No Brasil, a área plantada de trigo para a safra de 2015 foi de 2.448,8 hectares e a produção foi de 5.534,9 toneladas, 11,4% maior do

que a safra anterior, a média da produção foi de 2.260 kg ha⁻¹. A região Sul é a principal produtora com 91,55%, seguida pela região Sudeste com 7,15%, e a região Centro-Oeste com 1,3%, (CONAB, 2016).

A espécie *Triticum aestivum* L. é classificada como não acumuladora de Se (Terry et al., 2000), porém as concentrações de micronutrientes nos grãos podem variar de acordo com a disponibilidade do Se no solo onde a planta se desenvolve (ZHU et al., 2009). Na Inglaterra, Adams et al. (2002) observaram uma variação entre 6 e 858 µg kg⁻¹ de Se nos grãos, e, Lyons et al. (2005) observaram em plantas cultivadas em solução nutritiva, a concentração entre 600 e 11.950 µg kg⁻¹ de Se. Além disso, a concentração de Se no grão pode variar de acordo com o meio pelo qual o elemento foi fornecido. Lyons et al. (2004) observaram que o fornecimento via solo aumentou a concentração do Se nos grãos de trigo, entre 20 e 133 vezes, enquanto o fornecimento via foliar aumentou a concentração, entre seis e 20 vezes, em ambos os casos, se comparado ao controle, a produtividade de grãos neste trabalho foi entre 1,4 e 1,8 t ha⁻¹.

O Se nos grãos de trigo maduro se encontra principalmente na forma orgânica de selenometionina (56 a 100%), porém, pode estar presente em outras formas e em concentrações menores, como: selenato (5 a 19%), selenocisteína (4-12%), selenometil-selenocisteína (1-4%) e outros (4-26%) (Whanger, 2002; Galinha et al., 2015). O acúmulo de Se nos grãos de trigo na forma orgânica de selenometionina o torna altamente biodisponível, acima de 90%, ao passo que, formas inorgânicas com selenato, não ultrapassam 50% (THOMSON, 2004).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica de biofortificação está sendo amplamente discutida no meio acadêmico, como uma estratégia eficiente no combate à desnutrição mineral em humanos. A utilização dessa técnica, não envolve novas tecnologias, o que a torna de fácil acesso. Várias culturas estão sendo estudadas, porém os cereais são de especial interesse, destacando-se, dentre eles o trigo, que é uma espécie estratégica, devido a sua ampla adaptação a diferentes tipos de solo e clima. Além disso, os produtos comerciais provenientes do trigo são utilizados por todas as classes sociais.

Embora a biofortificação com Se tenha sido muito estudada em anos recentes, a maioria dos trabalhos foram realizados em ambientes protegidos, o que minimiza a influência do ambiente e gera dados não extrapolados para o campo. Com isso, estudos em campo são de fundamental importância para identificar a verdadeira eficiência da técnica de biofortificação com Se, não somente visando o aumento dos níveis de Se em plantas e em animais que delas se alimentam, mas também para se avaliar o real efeito benéfico do Se para a produção de grãos e de biomassa dos vegetais. Neste contexto, é de especial interesse a avaliação não somente de aspectos agronômicos, mas também fisiológicos e bioquímicos relacionados à biofortificação agronômica com Se (via suprimento solo ou foliar de selênio), visto que estes últimos são fundamentais para se explicarem eventuais ganhos agronômicos e de valor nutricional.

Observamos neste estudo que, a suplementação com selênio, via solo e folha, promoveu o enriquecimento adequado dos grãos de trigo, justificando o uso dessa espécie para a biofortificação agronômica. Além disso, a suplementação via folha é a mais indicada para a biofortificação agronômica do trigo, pois proporcionou incrementos nos teores de Se e na produtividade de

grãos, além de que, a adubação foliar com micronutrientes é uma técnica usada rotineiramente pelos agricultores.

Dentre os tratamentos utilizados na suplementação foliar, aquele que proporcionou os melhores resultados foi 21 g ha⁻¹ de Se, uma vez que elevou os teores de Se nos grãos e promoveu os incrementos na produtividade de grãos, na taxa fotossintética líquida, nos teores de carboidratos analisados, na atividade da enzima peroxidação do ascorbato e no teor de nitrogênio total.

REFERÊNCIAS

- ABITRIGO. **O que é o trigo**. [2016?]. Disponível em: <<http://www.abitrigo.com.br/index.php?mpg=02.00.00>>. Acesso em: 20 abr. 2016.
- ADAMS, M. L. et al. Evidence of low selenium concentrations in UK bread-making wheat grain. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 82, n. 10, p. 1160-1165, Aug. 2002.
- ÁVILA, F. W. et al. Impact of selenium supply on Se-methylselenocysteine and glucosinolate accumulation in selenium-biofortified *Brassica sprouts*. **Food Chemistry**, London, v. 165, p. 578-586, Dec. 2014.
- BARROW, N. J.; WHELAN, B. R. Testing a mechanistic model. VIII. The effects of time and temperature of incubation on the sorption and subsequent desorption of selenite and selenate by a soil. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 40, n. 1, p. 29-37, Mar. 1989.
- BLEYS, J.; NAVAS-ACIEN, A.; GUALLAR, E. Serum Selenium and Diabetes in U.S. Adults. **Diabetes Care**, Alexandria, v. 30, n. 4, p. 829-834, Apr. 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Trigo**. [201-]. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/trigo>>. Acesso em: 30 abr. 2016.
- BROADLEY, M. R. et al. Selenium biofortification of high-yielding winter wheat (*Triticum aestivum* L.) by liquid or granular Se fertilisation. **Plant and Soil**, The Hague, v. 332, n. 1, p. 5-18, July 2010.
- CARDOSO, B. R. et al. Nutritional status of selenium in Alzheimer's disease patients. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 103, n. 6, p. 803-806, Mar. 2010.
- CARTES, P. et al. Selenium improves the antioxidant ability against aluminium-induced oxidative stress in ryegrass roots. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v.156, n. 2, p. 297-307, Mar. 2010.
- CARVALHO, G. S. **Selênio e mercúrio em solos sob Cerrado nativo**. 2011. 93 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

CHEN, L. et al. Effects of nitrogen forms on the growth, ascorbate-glutathione cycle and lipid peroxidation in developing seeds of vegetable soybean. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 4, n. 11, p. 1178-1188, Nov. 2009.

CHEN, T. F. et al. Selenium induced changes in activities of antioxidant enzymes and content of photosynthetic pigments in *Spirulina platensis*. **Journal of Integrative Plant Biology**, New York, v. 50, n.1, p. 40-48, Jan. 2008.

CHU, J.; YAO, X.; ZHANG, Z. Responses of wheat seedlings to exogenous selenium supply under cold stress. **Biological Trace Element Research**, Clifton, v. 136, n. 3, p. 355-363, Sept. 2010.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Brasília, v. 3, n. 9, jun. 2016. Safra 2015/16.

Disponível em:

<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_06_09_16_49_15_boletim_graos_junho__2016_-_final.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2016.

CONSEIL SUPÉRIEUR DE LA SANTÉ. **Recommandations nutritionnelles pour la Belgique**. Bruxelles, n. 8309, 2009. Disponível em:

<http://www.health.belgium.be/internet2Prd/groups/public/@public/@shc/documents/ie2divers/12352470_fr.pdf>. Acesso em: 30 abr. 2012.

DIAO, M. et al. 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, Sept. 2014.

DJANAGUIRAMAN, M. et al. Impact of selenium spray on monocarpic senescence of soybean (*Glycine max.* L). **Food, Agriculture and Environment**, Helsinki, v. 2, n. 2, p. 44-47, Apr. 2004.

DJANAGUIRAMAN, M. et al. Selenium: an antioxidative protectant in soybean during senescence. **Plant and Soil**, The Hague, v. 272, n. 1, p. 77-86, May 2005.

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

DURÁN, P. et al. Enhanced selenium content in wheat grain by co-inoculation of selenobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi: a preliminary study as a potential Se biofortification. **Journal of Cereal Science**, London, v. 57, n. 3, p. 275-280, May 2013.

ELLIS, D. R. et al. Production of Se-methylselenocysteine in transgenic plants expressing selenocysteine methyltransferase. **BMC Plant Biology**, London, v. 4, n.1, p. 1-11, Jan. 2004.

ELLIS, D. R.; SALT, D. E. Plants, selenium and human health. **Current Opinion in Plant Biology**, Amsterdam, v. 6, n. 3, p. 273-279, June 2003.

ELRASHIDI, M. A. et al. Chemical equilibria of selenium in soils: a theoretical development. **Soil Science**, Baltimore, v. 144, n. 2, p. 41-152, July 1987.

ENDE, W. V.; EL-ESAWI, S. K. Sucrose signaling pathways leading to fructan and anthocyanin accumulation: A dual function in abiotic and biotic stress responses? **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 108, p. 4-13, Dec. 2014.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for selenium. **EFSA Journal**, Parma, v. 12, n. 10, p. 1-67, 2014. Disponível em:
<http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/3846.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2016.

FAIRWEATHER-TAIT, S. J. et al. Selenium in human health and disease. **Antioxidants and Redox Signaling**, [New York], v. 14, n. 7, p. 1337-1383, Apr. 2011.

FAO/WHO. **Human vitamin and mineral requirements**. 2001. Report of a joint FAO/WHO expert consultation, Bangkok, Thailand. Disponível em:
<<http://www.fao.org/docrep/004/y2809e/y2809e00.htm>>. Acesso em: 20 abr. 2016.

FARIA, L. de A. **Levantamento sobre selênio em solos e plantas do Brasil e sua aplicação em plantas forrageiras**. 2009. 75 p. Dissertação (Mestrado em Qualidade e Produtividade e Animal)-Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2009.

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

FENG, R.W.; WEI, C. Y. Antioxidative mechanisms on selenium accumulation in *Pteris vittata* a potential selenium phytoremediation plant. **Plant, Soil and Environment**, Slezská, v. 58, n. 3, p. 105-110, 2012.

FILEK, M. et al. The protective role of selenium in rape seedlings subjected to cadmium stress. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 165, n. 8, p. 833-844, May 2008.

FREEMAN, J. L. et al. Molecular mechanisms of selenium tolerance and hyperaccumulation in *Stanleya pinnata*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 153, n. 4, p. 1630-1652, May 2010.

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, Oct. 2014.

GALEAS, M. L. et al. Selenium hyperaccumulation reduces plant arthropod loads in the field. **New Phytologist**, Cambridge, v. 177, n. 3, p. 715-724, 2008.

GALINHA, C. et al. Characterization of selenium-enriched wheat by agronomic biofortification. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 52, n. 7, p. 4236-4245, July 2015.

GERENDAS, J. et al. Influence of sulfur and nitrogen supply on growth nutrient status and concentration of benzyl-isothiocyanate in cress (*Lepidium sativum* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 88, n. 14, p. 2576-2580, Nov. 2008.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 48, n.12, p. 909-930, 2010.

GUPTA, U. C.; WATKINSON, J. H. Agricultural significance of selenium. **Outlook on Agriculture**, Elmsford, v. 14, p. 183-189, 1985.

HAJIBOLAND, R.; KEIVANFAR, N. Selenium supplementation stimulates vegetative and reproductive growth in canola (*Brassica napus* L.) plants. **Acta Agriculturae Slovenica**, Ljubljana, v. 99, n. 1, p. 13-19, Dec. 2011.

HAJIBOLAND, R.; SADEGHZADE, N. Effect of selenium on CO₂ and NO₃⁻ assimilation under low and adequate nitrogen supply in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Photosynthetica**, Prague, v. 4, n. 4, p. 501-510, Dec. 2014.

HAJIBOLAND, R.; SADEGHZADEH, N.; SADEGHZADEH, B. Effect of Se application on photosynthesis, osmolytes and water relations in two durum wheat (*Triticum durum* L.) genotypes under drought stress. **Acta agriculturae Slovenica**, Ljubljana, v. 103, n. 2, p. 167-179, Sept. 2014.

HARTIKAINEN, H.; XUE, T.; PIIRONEN, V. Selenium as an antioxidant and pro-oxidant in ryegrass. **Plant and Soil**, The Hague, v. 225, n. 1, p. 193-200, Oct. 2000.

HASANUZZAMAN, M.; HOSSAIN, M. A.; FUJITA, M. Selenium-induced up-regulation of the antioxidant defense and methylglyoxal detoxification system reduces salinity-induced damage in rapeseed seedlings. **Biological Trace Element Research**, Clifton, v. 143, n. 3, p. 1704-1721, Dec. 2011.

HASANUZZAMAN, M. et al. Modulation of antioxidant machinery and the methylglyoxal detoxification system in selenium-supplemented brassica napus seedlings confers tolerance to high temperature stress. **Biological Trace Element Research**, Clifton, v. 161, n. 3, p. 297-307, Dec. 2014.

HASANUZZAMAN, M.; FUJITA, M. Selenium pretreatment up-regulates the antioxidant defense and methylglyoxal detoxification system and confers enhanced tolerance to drought stress in rapeseed seedlings. **Biological Trace Element Research**, Clifton, v. 143, n. 3, p. 1758-1776, Dec. 2011.

HAWKESFORD, M. J. Sulphur. In: BROADLEY, M. R.; WHITE, P. J. (Ed.). **Plant Nutritional Genomics**. Oxford: Blackwell, 2005. p. 87-111.

HAWKESFORD, M. J.; ZHAO, F.-J. Strategies for increasing the selenium content of wheat. **Journal of Cereal Science**, London, v. 46, n. 3, p. 282-292, Nov. 2007.

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**, Warsaw, v. 37, n. 41, p. 1-13, Feb. 2015.

JEŽEK, P. et al. Effect of foliar application of selenium on the content of selected amino acids in potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). **Plant, Soil and Environment**, Slezská, v. 57, n. 7, p. 315-320, 2011.

KAUR, N. et al. Selenium in agriculture: a nutrient or contaminant for crops? **Archives of Agronomy and Soil Science**, [Abingdon], v. 60, n. 12, p. 1593-1624, May 2014.

KEUNEN, E. et al. Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept. **Plant, Cell and Environment**, New York, v. 36, n. 7, p. 1242-1255, July 2013.

KIBINZA, S. et al. Catalase is a key enzyme in seed recovery from ageing during priming. **Plant Science**, Limerick, v. 181, n. 3, p.309-15, Sept. 2011.

KIPP, A. P. et al. Revised reference values for selenium intake. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, [S.l.], v. 32, p. 195-199, Oct. 2015.

KOCH, K. E. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, p. 509-540, June 1996.

KUMAR, M. et al. Selenium and spermine alleviate cadmium induced toxicity in the red seaweed *Gracilaria dura* by regulating antioxidants and DNA methylation. **Plant Physiology Biochemistry**, New Delhi, v. 51, p. 129-138, Feb. 2012.

LEDUC, D. L. et al. Overexpression of selenocysteine methyltransferase in *Arabidopsis* and *Indian mustard* increases selenium tolerance and accumulation. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 135, n. 1, p. 377-383, May 2004.

LEMIRE, M. et al. Elevated levels of selenium in the typical diet of Amazonian riverside populations. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 408, n. 19, p. 4076-4084, Sept. 2010.

LEMIRE, M. et al. Elevated blood selenium levels in the Brazilian Amazon. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 366, n. 1, p. 101-111, July 2006.

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. et al. Variations in the accumulation, localization and rate of metabolization of selenium in mature *Zea mays* plants supplied with selenite or selenate. **Food Chemistry**, London, v. 182, p. 128-135, Sept. 2015.

LYONS, G. et al. Selenium concentration in wheat grain: is there sufficient genotypic variation to use in breeding? **Plant and Soil**, The Hague v. 269, n. 1, p. 369-380, Feb. 2005.

LYONS, G. H. et al. High-selenium wheat: Agronomic biofortification strategies to improve human nutrition. **Food, Agriculture and Environment**, Helsinki, v. 2, n. 1, p. 171-178, 2004.

LYONS, G. H. et al. Selenium increases seed production in Brassica. **Plant and Soil**, The Hague, v. 318, n. 1, p. 73-80, May 2009.

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

MAIHARA, V. A. et al. Daily dietary selenium intake of selected Brazilian population groups. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, Lousanne, v. 259, n. 3 p. 465-468, Mar. 2004

MALIK, J. A. et al. Selenium antagonises the toxic effects of arsenic on mungbean (*Phaseolus aureus* Roxb.) plants by restricting its uptake and enhancing the antioxidative and detoxification mechanisms. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 77, p. 242-248, Apr. 2012.

MEHDAWI, A. F. et al. Analysis of selenium accumulation, speciation and tolerance of potential selenium hyperaccumulator *Symphyotrichum ericoides*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 152, n. 1, p. 70-83, Sept. 2014. .

MEHDI, Y. et al. Selenium in the Environment, Metabolism and Involvement in Body Functions. **Molecules**, Basel, v. 18, n. 3, p. 3292-3311, Mar. 2013.

MILLAR, K. R. Selenium. In: GRACE, N. D. (Ed.). **The mineral requirements of grazing ruminants**. [New York]: New Zealand Society of Animal Production, 1983. p. 38-47.

MILLER, A. J.; CRAMER, M. D. Root nitrogen acquisition and assimilation. Root Physiology: from Gene to Function. **Plant Ecophysiology**, [New York], v. 4, p. 1-36, 2005.

MISSANA, T.; ALONSO, U.; GARCÍA-GUTIÉRREZ, M. Experimental study and modeling of selenite sorption onto illite and smectite clays. **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v. 334, n. 2, p. 132-138, June 2009.

MORA, M. L. et al. Improving selenium status in plant nutrition and quality. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Temuco, v.15, n. 2, p. 486-503, June 2015.

NAWAZ, F. et al. Selenium (Se) regulates seedling growth in wheat under drought stress. **Advances in Chemistry**, Cairo, v. 2014, p. 1-8, Aug. 2014.

NAWAZ, F. et al. Supplemental selenium improves wheat grain yield and quality through alterations in biochemical processes under normal and water deficit conditions. **Food Chemistry**, London, v. 175, p. 350-357, May 2015

NEUHIER, B. et al. A family of S-methylmethionine-dependent thiol/selenol methyltransferases. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 274, n. 9, p. 5407-5414, Feb. 1999.

NUNES-NESI, A.; FERNIE, A. R.; STITT, M. Metabolic and signaling aspects underpinning the regulation of plant carbon nitrogen interactions. **Molecular Plant**, Saint Paul, v. 3, n. 6, p. 973-996, Nov. 2010.

OWUSU-SEKYERE, A. et al. Influence of selenium (Se) on carbohydrate metabolism, nodulation and growth in alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Plant and Soil**, The Hague, v. 373, n.1, p. 541-552, Dec. 2013.

PEDRERO, Z.; MADRID, Y. Novel approaches for selenium speciation in foodstuffs and biological specimens: a review. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 634, n. 2, p. 135-152, Feb. 2009.

PILON-SMITS, E. A. H.; QUINN, C. F. Selenium Metabolism in Plants. **Cell Biology of Metals and Nutrients**, [New York], v. 17, p. 225-241, 2010.

RAMOS, S. J. et al. Response of brachiaria grass to selenium forms applied in a tropical soil. **Plant, Soil and Environment**, Slezská, v. 58, n. 11, p. 521-527, Dec. 2011a.

RAMOS, S. J. et al. Selenato e selenito na produção, nutrição mineral e biofortificação com selênio em cultivares de alfafa. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 35, n. 4, p. 1347-1355, jul./ago. 2011b.

- RAYMAN, M. P. Food-chain selenium and human health: emphasis on intake. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 100, n. 2, p. 254-268, Aug. 2008.
- RAYMAN, M. P. Selenium and human health. **The Lancet**, London, v. 379, n. 9822, p. 1256-1268, Mar. 2012.
- RAYMAN, M. P. The use of high-selenium yeast to raise selenium status: how does it measure up? **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 92, n. 4, p. 557-573, Oct. 2004.
- REEVES, M. A.; HOFFMANN, P. R. The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 66, n. 15 p. 2457-2478, Aug. 2009.
- RIOS, J. J. et al. Biofortification of Se and induction of the antioxidant capacity in lettuce plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 116, n. 3, p. 248-255, May 2008. .
- RÍOS, J. J. et al. Nitrogen-use efficiency in relation to different forms and application rates of Se in lettuce plants. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 29, n. 2, p. 164-170, June 2010.
- ROITSCH, T.; GONZÁLEZ, M. C. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. **TRENDS in Plant Science**, Oxford, v. 9, n. 12, p. 606-613, Dec. 2004.
- SAIRANEN, I. et al. Soluble Carbohydrates Regulate Auxin Biosynthesis via PIF Proteins in *Arabidopsi*. **Plant Cell**, Rockville, v. 24, n. 12, p. 4907-4915, Dec. 2012.
- SANTOS, L. B. et al. Correlation between plasma selenium concentration, gender and age. **NutrIRE**, São Paulo, v. 29, p. 36-36, maio 2014. Suplemento - Anais do Congresso Mundial Bioavailability.
- SANTOS, L. B. et al. Plasma selenium concentration in different groups from a rich Brazilian selenium area. **NutrIRE**, São Paulo, v. 29, p. 54-54, maio 2014. Suplemento, Anais do Congresso Mundial Bioavailability.
- SIEPRAWKA, A. KORNAS, A.; FILEK, M. Involvement of selenium in protective mechanisms of plants under environmental stress conditions-review. **Acta Biologica Cracoviensia**, Krakow, v. 57, n. 1, p. 9-20, June 2015.

SIMA, P.; GISSEL-NIELSEN, G. Spraying of crops with selenium. **Acta Agriculturae Scandinavica**, Stockholm, v. 35, n. 2, p. 161-164, 1985.

SORS, T. G. et al. Role of sulfur assimilating enzymes in selenate reduction, tolerance and accumulation in *Astragalus*. **Plant Journal**, Oxford, v. 42, p. 785-797, 2005.

SPADONI, M. et al. Bioaccessible selenium in Italian agricultural soils: Comparison of the biogeochemical approach with a regression model based on geochemical and pedoclimatic variables. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 376, n. 1-3, p. 160-177, Apr. 2007.

STADTMAN, T. C. Selenocysteine. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 65, p. 83-100, 1996.

SUZUKI, N. et al. ROS and redox signaling in the response of plants to abiotic stress. **Plant, Cell and Environment**, New York, v. 35, n. 2, p. 259-270, Feb. 2012.

TERRY, N. et al. Selenium in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 51, p. 401-432, 2000.

THOMSON, C. D. Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 58, n. 3, p. 391-402, Mar. 2004.

WANG, R. et al. Effects of soil Se application on photosynthetic characteristics and assimilate accumulation of flue-cured tobacco. **Chinese Tobacco Science**, [Beijing], v. 32, n. 1, p. 22-26, 2011.

WANG, Y.; BOCK, A.; NEUHIER, I. Acquisition of selenium tolerance by a selenium non-accumulating *Astragalus* species via selection. **Biofactors**, [S.l.], v. 9, n. 1, p. 3-10, 1999.

WHANGER, P. D. Selenocompounds in plants and animals and their biological significance. **Journal of the American of College Nutrition**, Clearwater, v. 21, n. 3, p. 223-232, June 2002.

WHITE, P. J. et al. Interactions between selenium and sulphur nutrition in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 404, p. 1927-1937, Aug. 2004.

XIA, Y. et al. Optimization of selenoprotein P and other plasma selenium biomarkers for the assessment of the selenium nutritional requirement: a placebo-controlled, double-blind study of selenomethionine supplementation in selenium-deficient Chinese subjects. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 92, n. 3, p. 525-531, Sept. 2010.

XU, Z. C. et al. Effects of different selenium concentrations on invertase and nitrate reductase activities of flue-cured tobacco. **Food Agriculture and Environment**, Helsinki, v. 11, n. 3-4, p. 964-967, 2013.

XUE, T. L. et al. The antioxidative function of selenium in higher plants: II. Non-enzymatic mechanisms. **Chinese Science Bulletin**, [S.l.], v. 38, p. 356-358, 1993.

YAO, X. et al. Protective role of selenium in wheat seedlings subjected to enhanced UV-B radiation. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v. 58, n. 2, p. 283-289, Mar. 2011.

ZHANG, M. et al. 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, Nov. 2014.

ZHANG, Y. et al. Chilling acclimation induced changes in the distribution of H₂O₂ and antioxidant system of strawberry leaves. **Agricultural Journal**, Bridgetown, v. 3, n. 4, p. 286-291, 2008.

ZHU, Y. G. et al. Selenium in higher plants: understanding mechanisms for biofortification and phytoremediation. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 14, n. 8, p. 436-442, Aug. 2009.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

**ARTIGO 1 - BIOFORTIFICAÇÃO AGRONÔMICA DO TRIGO COM
SELÊNIO VIA FOLHA**

Artigo formatado de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2003).

RESUMO

A biofortificação do trigo com selênio (Se) é uma alternativa para amenizar a deficiência humana, a este elemento, além de poder, trazer benefícios para as plantas. Esse trabalho teve como objetivos: i) estudar a eficiência do trigo como espécie indicada para a biofortificação agronômica com Se em campo, através da suplementação via folha; e, ii) estudar a influência do Se suprido via folha no metabolismo dos carboidratos, nitrogênio e no sistema antioxidante de plantas de trigo. As concentrações utilizadas foram 12; 21; 38; 68 e 120 g ha⁻¹ de Se, que foram divididas em duas aplicações, via folha, sendo a fonte utilizada, o selenato de sódio. O tratamento com 120 g ha⁻¹ de Se proporcionou as maiores concentrações de Se nos grãos (2,86 mg kg⁻¹ de Se) e na parte aérea (2,32 e 1,20 mg kg⁻¹ de Se na massa seca da primeira e segunda coleta, respectivamente). O tratamento com 21 mg ha⁻¹ de Se proporcionou incrementos de 48% na produção final de trigo e 30% na produção de biomassa, além de aumentar a taxa fotossintética líquida, resultados esses comparados ao tratamento controle. A atividade da enzima peroxidase do ascorbato (APX) foi influenciada positivamente pela presença do Se. Os tratamentos com 21 e 38 g ha⁻¹ de Se proporcionaram incremento no teor de N-total. Na segunda coleta, os teores de carboidratos foram fortemente influenciados pelo Se. O trigo é uma espécie indicada para realizar a biofortificação agronômica com Se, pois concentra Se nos grãos, sem prejudicar o crescimento vegetativo. Enfim, de um modo geral, o Se proporcionou incrementos nos teores de carboidratos, na atividade da APX e no teor de N-total, o que favoreceu o aumento da produção e o acúmulo de biomassa.

Palavras-chave: Elemento benéfico. Selenato. Campo. Foliar. Produção.

Agronomic biofortification of wheat with selenium via leaf

ABSTRACT

Wheat biofortification with selenium (Se) is an alternative to relieve human deficiency of this element, and to benefit plants. This work had the objectives of: i) study the efficiency of wheat as a species indicated for agronomic biofortification with Se, in the field; and, ii) study the influence of Se, suppressed via leaf, over the metabolism of carbohydrates, nitrogen and the antioxidant system of wheat plants. The concentrations used were of 12, 21, 38, 68 and 120 g ha⁻¹ of Se, divided into two applications, via leaf, using sodium selenate as source. The treatment with 120 g ha⁻¹ of Se promoted higher concentrations of Se in the grains (2.86 mg kg⁻¹ of Se) and in the aerial part (2.32 and 1.20 mg kg⁻¹ of Se in the dry mass of the first and second sampling, respectively). The treatment with 21 mg kg⁻¹ of Se promoted increments of 48% in the final production of wheat, and 30% in the production of biomass, in addition to increasing net photosynthetic rate. These results were compared to the control treatment. The activity of enzyme ascorbate peroxidase (APX) was positively influenced by the presence of Se. The treatments with 21 and 38 g ha⁻¹ of Se promoted increment in the content of total-N. In the second sampling, the contents of carbohydrates were strongly influenced by the Se. Wheat is a species indicated for agronomic biofortification with Se, given that Se concentrates in the grains without damaging vegetative growth. Finally, in general, Se promoted increments in the contents of carbohydrates, activity of APX and in the content of total-N, which favored the increase in production and accumulation of biomass.

Keywords: Beneficial element. Selenate. Field. Production.

1 INTRODUÇÃO

O selênio (Se) é um elemento essencial para os mamíferos, sendo componente de aproximadamente 30 selenoproteínas ou selenoenzimas (RAYMAN, 2012). A taxa de Se no plasma sanguíneo entre 130 e 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Se representa a taxa mínima de mortalidade de adultos Norte Americanos com problemas vasculares e com câncer (BLEYS et al., 2007). Para alcançar estes níveis de Se no plasma é necessário uma ingestão de no mínimo 1,87 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de Se de peso corporal por dia, o que é equivalente a uma ingestão de 112 e 150 $\mu\text{g dia}^{-1}$ de Se para pessoas com 60 e 80 kg, respectivamente (HAWKESFORD; ZHAO, 2007). Estima-se, portanto, que aproximadamente um bilhão de pessoas estão deficientes em Se (MORA et al., 2015).

Em virtude disso, a biofortificação com Se está sendo estudada como alternativa para combater a desnutrição. O trigo vem sendo utilizado nesse processo (GALINHA et al., 2015), por se tratar do segundo cereal mais cultivado mundialmente (BRASIL, 2011), sendo amplamente utilizado na alimentação humana para a produção de pães, farinhas, massas e bolos (LYONS; STANGOULIS; GRAHAM, 2003). Além disso, o Se nos grãos de trigo encontra-se principalmente na forma orgânica de selenometionina (56 a 100%), e em menores proporções em outras formas como selenato (5 a 19%), selenocisteína (4 a 12%), selenometil-selenocisteína (1 a 4%) e outros (4 a 26%) (WHANGER, 2002; GALINHA et al., 2015). O acúmulo de Se na forma orgânica de selenometionina o torna altamente biodisponível (acima de 90%), ao passo que, em formas inorgânicas como, o selenato não ultrapassa 50% (THOMSON, 2004).

A ação do Se em plantas superiores é estudada há quase 70 anos e sua essencialidade ainda não foi confirmada (LYONS et al., 2008). Contudo as investigações continuam, estudos têm demonstrado que, em concentrações adequadas, o Se pode ser benéfico às plantas aumentando a produção em trigo

(NAWAZ et al., 2014) e arroz (ZHANG et al., 2014), além de aumentar o acúmulo de biomassa da parte aérea em trigo (GUERRERO et al., 2014; HAJIBOLAND; SADEGHZADE, 2014). Estas respostas podem estar associadas a maior atividade de algumas enzimas do sistema antioxidante, aos incrementos na taxa fotossintética líquida que pode elevar os teores de carboidratos, e também, a uma influência positiva do Se no metabolismo dos aminoácidos, o que pode levar a uma maior absorção e assimilação do nitrogênio (GUERRERO et al., 2014; HAJIBOLAND; SADEGHZADE, 2014; JEŽEK et al., 2011; NAWAZ et al., 2014; OWUSU-SEKYERE et al., 2013; ZHANG et al., 2014).

Apesar dos estudos recentes, até o momento são poucos os trabalhos em condições de campo que visam demonstrar a eficiência da biofortificação agronômica com Se em trigo e a influência desse elemento no metabolismo vegetal, de forma integrada. Neste sentido, objetivou-se, neste trabalho, avaliar a eficiência do trigo como espécie indicada para a biofortificação agronômica com Se em campo, através da suplementação via folha, bem como estudar a influência do Se suprido via folha no metabolismo dos carboidratos, nitrogênio e no sistema antioxidante das plantas de trigo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Instalação do experimento

O ensaio foi conduzido na fazenda experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) em Lambari. Aproximadamente, 30 dias antes do plantio foi realizada a calagem com 4 t ha^{-1} e o índice de saturação de base foi elevado a 50%. O plantio do trigo (*Triticum aestivum* L.) variedade BRS 264 foi realizado dia 25/05/2015, com adubação básica de 300 kg ha^{-1} de fertilizante 8-28-16 (N-P₂O₅-K₂O), sendo que a adubação de cobertura ocorreu no dia 22/06/2015, com 170 kg ha^{-1} de 20-00-20. Os atributos químicos e granulométricos do solo onde o experimento foi instalado encontram-se nas **Tabelas 1, 2 e 3**, respectivamente. A precipitação total foi de 236 mm e as temperaturas mínimas e máximas foram de 3°C e 34°C, respectivamente.

Tabela 1 - Atributos químicos do solo utilizado no cultivo do trigo.

	K	P	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	t	T	V	m	
pH	--mg dm ⁻³ --		-----cmol dm ⁻³ -----			-----cmolc dm ⁻³ -----			----%----			
	5,1	62,0	17,5	1,3	0,3	0,8	7,8	1,7	2,5	9,6	18,2	31,2

pH em água, KCl e CaCl= Relação 1:2:5; Ca, Mg e Al Extrator KCl (1 mol L⁻¹); H + Al= Extrator: SMP; SB= Soma de bases trocáveis; CTC (t)= Capacidade de trocas catiônicas efetiva; CTC (T)= Capacidade de trocas catiônicas a pH= 7; V= Índice de saturação por base;; B- Extrator água quente; m= índice de saturação de Alumínio.

Tabela 2 - Atributos químicos do solo utilizado no cultivo do trigo.

M.O.	P-Rem	Zn	Fe	Mn	Cu	B	S	
dag kg ⁻¹	-----mg L ⁻¹ -----		-----mg dm ⁻³ -----					
	3,8	4,8	2,3	28,2	8,4	1,2	0,10	22,4

M.O. = Matéria orgânica- Na₂Cr₂O₇ 4N+ HeSO₄ 10N; P-rem= Fosforo remanescente; P, K, Fe, Zn, Mn e Cu Extrator Mehlich; B Extrator água quente.

Tabela 3 - Análise granulométrica do solo utilizado no cultivo do trigo.

Classificação do solo	Argila	Silte	Areia
	-----dag kg ⁻¹ -----		
	42	19	39

As concentrações de Se utilizadas para os tratamentos foram de 12; 21; 38; 68 e 120 g ha⁻¹ de Se. A fonte utilizada para disponibilizar o Se para as plantas, via folha, foi o selenato de sódio (Na₂SeO₄), sendo as doses divididas em duas aplicações com concentrações iguais, à primeira no dia 30/06/2015 (fase de emborrachamento) e a segunda no dia 10/08/2015 (fase de enchimento de grão). O Na₂SeO₄ foi diluído em 600 mL de água deionizada, e a essa solução foi acrescentado surfactante (óleo vegetal) na concentração de 0,05%. As aplicações foliares foram realizadas com uma bomba pressurizada com contêiner de dióxido de carbono acoplado. Foi conectada à bomba uma barra com 2 metros de comprimento, para que desse modo à aplicação fosse uniforme e abrangesse toda a largura da parcela em uma única aplicação. As aplicações ocorreram aos finais das tardes, dos respectivos dias de aplicação, para proporcionar uma maior absorção do Se.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, com quatro repetições. As parcelas deste experimento foram de 10 m² (5 metros de comprimento por 2 metros de largura) e o espaçamento entre linha foi de 0,17 m, totalizando 12 linhas de plantio por parcela. O número de sementes por metro linear foi de 50 sementes. A área útil foi de 5,5 m², ou seja, 4 m de comprimento por 1,36 m de largura, o que representou oito linhas. O controle recebeu apenas 600 mL de água deionizada contendo também o surfactante. Assim, os cinco tratamentos mais o tratamento controle totalizaram 24 parcelas.

2.2 Análises fisiológicas e agronômicas

A seguir, estão descritas as metodologias empregadas para analisar as variáveis fisiológicas: quantificação dos teores de carboidratos, proteínas, peróxido de hidrogênio, malonaldeído, das atividades de algumas enzimas do sistema antioxidante, das invertases e da taxa fotossintética líquida, além de quantificar os teores totais de aminoácidos, selênio, nitrogênio e enxofre. Para as análises *in vitro* e da fotossíntese utilizou-se apenas a folha bandeira, enquanto que, para o restante das análises, o material foi oriundo da quantificação da massa seca, ou seja, toda a parte aérea excluindo apenas as panículas existentes. As análises agronômicas avaliadas foram: quantificação de biomassa da parte aérea, produtividade de grãos, grau de umidade e peso de 1000 grãos. As coletas de material para as análises foram feitas, na área útil, aos 14 dias após a primeira adubação com Se. Além disso, também ocorreram coletas aos 16 dias após a segunda adubação com Se, para a quantificação dos teores de carboidratos, proteínas, aminoácidos e Se. A análise de produtividade de grãos foi realizada através da colheita e pesagem da área útil.

2.2.1 Quantificação da biomassa da parte aérea e dos teores de carboidratos, proteínas e aminoácidos totais

As coletas do material para a quantificação da biomassa e macromoléculas foram realizadas em duas épocas. Em cada época, foram coletadas seis plantas por parcela, sendo estas divididas em duas repetições de três plantas. Os materiais coletados foram secos em estufa com circulação forçada de ar a uma temperatura próxima a 60°C até peso constante. Posteriormente, as repetições com três plantas foram pesadas em balança analítica com precisão de 0,01 g. Deste material, foram retiradas amostras de 0,2 g de cada repetição para determinar os teores de amido, sacarose e açúcares solúveis totais utilizando o método da Antrona (DISCHE, 1962), de açúcares

redutores através do método DNS (MILLER, 1959) e de aminoácidos livres totais (COCKING; YEMM, 1954). O teor de proteínas foi determinado de acordo com Bradford (1976).

2.2.2 Análises de selênio (Se) e enxofre (S) na parte aérea e nos grãos

O material para a quantificação de Se e S na parte aérea foi proveniente do material utilizada para a quantificação da biomassa da parte aérea, em ambas as épocas de coleta para o Se e na última coleta para o S. Durante a moagem da parte aérea foram retiradas às panículas do trigo. O material para a quantificação de Se e S nos grãos foi coletado após a pesagem da produtividade de grãos. Os extratos para as quantificações de Se e S foram oriundos da digestão ácida de 0,5 g e 0,2 g de cada material, respectivamente, em blocos digestores. Para a digestão, foram adicionados 6 mL de uma mistura composta por ácido nítrico e perclórico na proporção 2:1 (v/v), sendo as amostras deixadas em repouso à temperatura ambiente, *overnight* e após, levadas a blocos digestores a 200°C durante 2 horas. Após a digestão completa, foram adicionados 10 mL de água destilada aos extratos. As determinações de Se e S foram realizadas utilizando-se um espectrofotômetro de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS). Ressalta-se que, juntamente com as amostras, o procedimento foi também realizado em padrão de referência certificado (BCR[®]-414 Plankton) visando demonstrar a confiabilidade nas determinações de Se.

2.2.3 Produtividade de grãos

A produtividade de grãos foi avaliada em cada parcela, onde foram descartadas as bordaduras nas quatro extremidades, sendo a colheita realizada manualmente. O peso de 1.000 grãos e a umidade dos grãos foi determinado de acordo com a Regra de Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

2.2.4 Enzimas invertase neutra do citosol (INC) e invertase ácida do vacúolo (IAV)

A extração e a incubação das invertases solúveis, invertase neutra do citosol (INC) e invertase ácida do vacúolo (IAV) foram realizadas conforme descrito por Zeng et al. (1999). O extrato enzimático foi obtido pela maceração em nitrogênio líquido de 0,5 g de folhas, homogenizadas em 2 mL do tampão de extração contendo HEPES 200 mM, pH 7,5, PMSF 1 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 1 mM e ácido ascórbico 50 mM, seguida pela centrifugação a 18.000 g, por 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi coletado e acrescido ao meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5 para a INC e em tampão citrato de sódio 200 mM, pH 4,5 para a IAV, além de MgCl₂ 5 mM e sacarose 200 mM em ambos os meios de reações. A incubação foi realizada em banho-maria, a 30 °C, por 40 minutos. Os açúcares redutores formados foram quantificados pelo método do DNS (MILLER, 1959).

2.2.5 Enzima invertase ácida da parede (IAP)

A extração e a incubação da invertase ácida da parede foram realizadas conforme descrito por Zeng et al. (1999). A extração foi realizada por meio da ressuspensão do *pellet* resultante da centrifugação para a quantificação das invertases solúveis. Utilizou-se 2 mL do tampão de extração contendo tampão citrato de sódio 200 mM, PMSF 1 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 1 mM, ácido ascórbico 50 mM e NaCl 1M, seguida pela centrifugação a 18.000 g, por 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi coletado e acrescido ao meio de reação contendo tampão citrato de sódio 200 mM, MgCl₂ 5 mM e sacarose 200 mM. A incubação foi realizada em banho-maria, a 30 °C, por 40 minutos. Os açúcares redutores formados foram quantificados pelo método do DNS (MILLER, 1959).

2.2.6 Trocas gasosas

As medidas de trocas gasosas foram realizadas em duas folhas intactas, completamente expandidas, e as leituras sempre realizadas na região mediana da folha e no período das 09h às 12h. A irradiação no interior da câmara fixada em $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As leituras foram realizadas em duas plantas diferentes em cada parcela. Utilizou-se o analisador de trocas gasosas por infravermelho (IRGA modelo LCA-4 ADC instruments). As medidas foram realizadas 14 dias após a primeira adubação foliar. A característica avaliada foi apenas a taxa fotossintética líquida (A).

2.2.7 Leituras com o SPAD

As leituras de SPAD foram obtidas através da média de cinco leituras na região mediada das folhas intactas e completamente expandidas, utilizando o medidor portátil de clorofila SPAD-502. Através das leituras do SPAD, pode-se inferir o conteúdo de clorofila total presente nas folhas.

2.2.8 Análise do teor de nitrogênio total na parte aérea

O material para a quantificação de nitrogênio foliar foi proveniente da massa seca obtida a partir da segunda época de coleta. O teor de N total foi determinado pela digestão sulfúrica e destilação Kjeldhal (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997).

2.2.9 Enzimas antioxidantes

O extrato enzimático foi obtido pela maceração em nitrogênio líquido de 0,2 g de folhas de massa fresca. Foram adicionados ao extrato enzimático 1,5 mL do tampão de extração contendo: tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,8), EDTA 0,1 M (pH 7,0), DTT 0,5 M, PMSF 0,1 M, ácido ascórbico 0,001 M e 22 mg de PVPP. O extrato foi centrifugado a 14.000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C durante o período das análises.

Os sobrenadantes coletados foram utilizados nas análises enzimáticas da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), redutase da glutatona (GR) e redutase do dehidroascorbato (BIEMELT; KEETMAN; ALBRECHT, 1998), conforme relatado a seguir. Para as análises foram utilizadas triplicatas e as leituras realizadas em espectrometria com placa de Elisa.

2.2.9.1 Dismutase do superóxido (SOD)

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977) em um meio de incubação composto por fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, metionina 14 mM, EDTA 0,1 μ M, NBT 75 μ M e riboflavina 2 μ M. Os tubos, com o meio de reação e a amostra, foram iluminados por 7 minutos com uma lâmpada fluorescente de 20W. Para o controle, o mesmo meio de reação sem a amostra foi iluminado. O branco foi mantido no escuro. As leituras foram realizadas a 560 nm e o cálculo da enzima foi feito com a seguinte equação: % de inibição = $(A_{560} \text{ amostra com extrato enzimático} - A_{560} \text{ controle sem enzima}) / (A_{560} \text{ controle sem enzima})$. Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições do ensaio.

2.2.9.2 Catalase (CAT)

A CAT foi avaliada segundo Havir e McHale (1987). A alíquota do extrato enzimático foi adicionada ao meio de incubação contendo fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0) e peróxido de hidrogênio 12,5 mM, incubado a 28°C. A atividade dessa enzima foi determinada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos, monitorado pelo consumo de peróxido de hidrogênio. O coeficiente de extinção molar utilizado foi de 36 mM cm^{-1} .

2.2.9.3 Peroxidase do ascorbato (APX)

A atividade da APX foi determinada pelo acompanhamento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos. O tampão de incubação foi composto por fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), ácido ascórbico 0,5 mM e peróxido de hidrogênio 0,1 mM (NAKANO; ASADA, 1981). O coeficiente de extinção molar utilizado foi de 2,8 mM cm⁻¹.

2.2.9.4 Redutase do dehidroascorbato (DHAR)

A atividade da DHAR foi realizada segundo Nakano e Asada (1981), em que o tampão de incubação composto por fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, glutathiona reduzida 2,5 mM, dehidroascorbato (DHA) 0,8 mM e EDTA 0,1 mM foi colocado em banho-maria, a 35°C, e a leitura realizada a 265 nm, observando-se o aumento na absorbância, que indica a formação de ascorbato (NAKANO; ASADA, 1981).

2.2.9.5 Redutase da glutathiona (GR)

A atividade da GR foi determinado segundo Cakmak, Strbac e Marschner (1993), monitorando-se a taxa de oxidação do NADPH por meio do decréscimo na absorbância a 340 nm por 3 minutos. O meio de incubação foi composto de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, glutathiona oxidada 1 mM e NADPH 75 µM.

2.2.10 Peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

O extrato enzimático foi obtido pela maceração em nitrogênio líquido de 0,2 g de folhas. Estas foram homogeneizadas em 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) e centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos, a 4°C. O H₂O₂ foi determinado medindo-se a absorbância a 390 nm em um meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, 500 µL do extrato e 1 mL de iodeto de potássio (VELIKOVA; YORDANOV; EDREVA, 2000).

2.2.11 Peroxidação lipídica (MDA)

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, conforme descrito por Buege e Aust (1978). Assim, 0,2 g de folhas foram macerados em N₂ líquido acrescido de 20% de PVPP (m/v) e homogeneizados em ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g, por 10 minutos. Alíquotas do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação (0,5% (m/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 10% (m/v) de TCA, incubando-se, em seguida, a 95°C, por 30 minutos. A reação foi paralisada por resfriamento rápido em gelo e as leituras foram determinadas em espectrofotômetro, a 535 nm e 600 nm. O TBA forma complexos de cor avermelhada, com aldeídos de baixa massa molecular, como o malondialdeído (MDA), produto secundário do processo de peroxidação. A concentração do complexo MDA/TBA foi calculada pela seguinte equação: $[MDA] = (A_{535} - A_{600})/(\epsilon \cdot b)$, em que: ϵ (coeficiente de extinção = $1,56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1}$); b (comprimento ótico = 1). A peroxidação foi expressa em nmol de MDA mg⁻¹ de matéria fresca.

2.3 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade e à análise de variância, sendo as médias submetidas ao teste de Skot-Knot ($p < 0,05$). Os gráficos foram feitos usando o Programa Sigma Plot (versão 12.5, Systat Software Chicago, IL, USA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

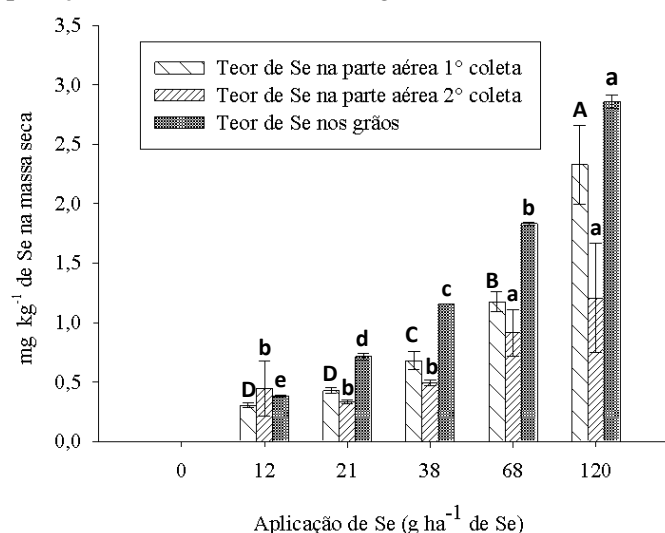
3.1 Teores de selênio (Se) e enxofre (S) nas folhas e nos grãos

A média da concentração de Se no material padrão de referencial Plankton (BCR[®]-414 Plankton) foi de 1,75 mg kg⁻¹ de Se, enquanto o valor certificado de Se no material é de 1,332 mg kg⁻¹ de Se. Assim, a recuperação nas amostras certificadas (média de 76%) tem uma precisão de dados analíticos confiáveis para análise de Se. Os teores de Se nos grãos e nas folhas do controle foi abaixo do limite de detecção, por outro lado, em todos os tratamentos que tiveram suplementação das plantas de trigo com Se observaram teores significativos. O tratamento com 120 g ha⁻¹ de Se proporcionou as maiores concentrações de Se nos grãos (2,86 mg kg⁻¹ de Se) e nas folhas (2,32 e 1,20 mg kg⁻¹ de Se na massa seca (MS) da primeira e segunda coleta, respectivamente) (Figura 1).

Nawaz et al. (2015) relataram teores de 1,7 mg kg⁻¹ de Se nas folhas de trigo, após a adubação foliar do trigo com 40 mg L⁻¹ de Se utilizando o selenato como fonte. Já, Ducsay e Ložek (2006) verificaram nas folhas, também em trigo, porém utilizando o selenito como fonte, teores de 0,088 e 0,145 mg kg⁻¹ de Se, após o tratamento via foliar com 10 e 20 g ha⁻¹ de Se, respectivamente. Esses teores são inferiores aos observados neste trabalho, uma vez que, após os tratamentos com 12 e 21 g ha⁻¹ de Se, foram identificados teores de 0,30 e 0,40 mg kg⁻¹ de Se, respectivamente. A maior concentração de Se proveniente da utilização do selenato como fonte é devido ao selenato ser mais móvel nos vasos condutores dos vegetais do que o selenito (RENKEMA et al., 2012). Além disso, verificaram-se neste trabalho reduções dos teores de Se nas folhas da segunda coleta (fase de enchimento de grão), quando comparada com as folhas da primeira coleta (estádio de emborrachamento). Esse comportamento foi observado por Sharma et al. (2010) em *Brassica napus*, o que foi atribuído à

translocação do Se das folhas para outros órgãos, incluindo as flores. Além disso, está ocorrendo diluição, pois na segunda coleta as plantas de trigo estavam maiores do que na primeira coleta.

Figura 1 - Efeito da aplicação foliar de concentrações crescentes de Se, nos teores de Se na parte aérea das plantas de trigo coletada 14 dias após a primeira aplicação de Se (1ª coleta) e 16 dias após a segunda aplicação de Se (2ª coleta) e nos grãos.



Legenda: A barra de erro representa o erro padrão das médias (n=4). Letras diferentes acima das colunas indicam diferença significativamente entre os tratamentos ao nível de 5% ($p < 0,05$) de probabilidade pelo teste Skott-Knott.

O tratamento com 120 g ha⁻¹ de Se proporcionou uma concentração semelhante aos 2,09 mg kg⁻¹ de Se nos grãos observado por Galinha et al. (2015), após a adubação foliar com 100 g ha⁻¹ de Se. Além disso, os teores de Se observados neste trabalho em decorrência dos tratamentos com 21 e 38 g de Se ha⁻¹ são semelhantes aos relatados por Poblaciones et al. (2014) em trigo, após adubação via foliar com 20 e 40 g ha⁻¹ de Se, os quais ficaram em torno de 0,71 e 1,15 mg kg⁻¹ de Se nos grãos (**Fig. 1**). Esses resultados comprovam a

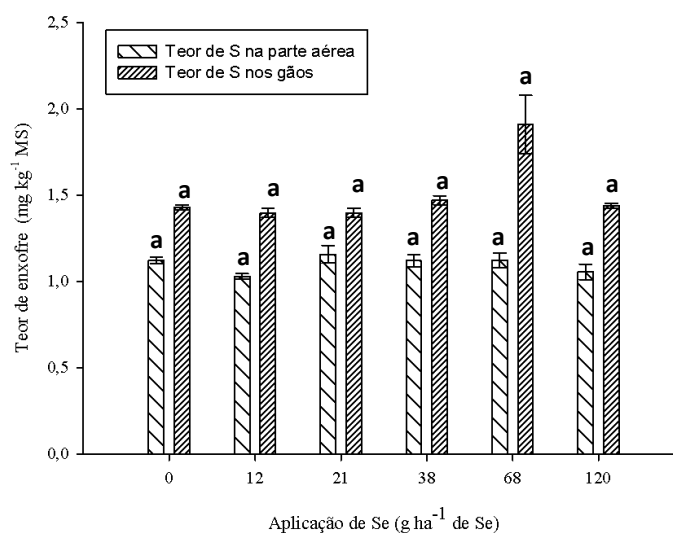
eficiência do trigo em concentrar Se nos grãos, apesar de o trigo ser considerada uma espécie não acumuladora de Se (TERRY et al., 2000).

O trigo é utilizado como matéria prima de vários produtos como o pão, massas, biscoitos e bolos. Desta forma, sua biofortificação o torna um dos produtos estratégicos no combate à deficiência nutricional (LYONS; STANGOULIS; GRAHAM, 2003). Atualmente, no Brasil, a média de consumo diária do trigo é 60 kg ano^{-1} ou 164 g dia^{-1} , média considerada ideal pela OMS (Organização Mundial da Saúde). Os biscoitos preparados com trigo biofortificados apresentam Se preferencialmente na forma de Se-metionina, cerca de 76 a 85% (Fenech et al., 2013), e, cerca de 96% do Se presente nos grãos se acumula da região do endosperma, o que diminui a perda de Se durante o processamento industrial do trigo (LYONS et al., 2005). Dessa forma, a utilização do trigo biofortificado é ideal para diminuir a deficiência nutricional pelo Se. De acordo com Bleys et al. (2007) a taxa de Se no plasma sanguíneo entre 130 e $150 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se representa a taxa mínima de mortalidade de adultos Norte Americanos com problemas vasculares e com câncer. Para se chegar a esses níveis é necessária uma ingestão de pelo menos $1,87 \mu\text{g kg}^{-1}$ de Se por peso corporal por dia, o que equivale à ingestão de 112 e $150 \mu\text{g dia}^{-1}$ de Se para pessoas com 60 e 80 kg, respectivamente (HAWKESFORD; ZHAO, 2007). Considerando os dados deste trabalho e as informações acima citadas, o tratamento com 21 g ha^{-1} de Se seria o mais indicado para a técnica de biofortificação, uma vez que proporcionou grãos com teores de $0,71 \text{ mg kg}^{-1}$ de Se. Porém, neste trabalho, os grãos de trigo foram apenas secos e descascados, não tendo passado por nenhum processo industrial.

As crescentes doses de Se não influenciou os teores de S nos grãos e na parte aérea (**Fig. 2**). Porém, Boldrin et al. (2013) em arroz, Ramos et al. (2011) em alface e Boldrin et al. (2016) em trigo observaram incrementos nos teores de S nas folhas. No entanto, Boldrin et al. (2016) observaram diminuição nos teores

de S nos grãos de trigo, o que não foi observado no presente estudo. O aumento nos teores de S nas folhas, possivelmente está ligado a uma maior expressão dos genes relacionados as proteínas transportadoras de sulfatos, presentes nas raízes (BOLDRIN et al., 2016).

Figura 2 - Efeito da aplicação foliar de concentrações crescentes de Se, nos teores de S na parte aérea das plantas de trigo coletada 16 dias após a segunda aplicação de Se (2^a coleta) e nos grãos.



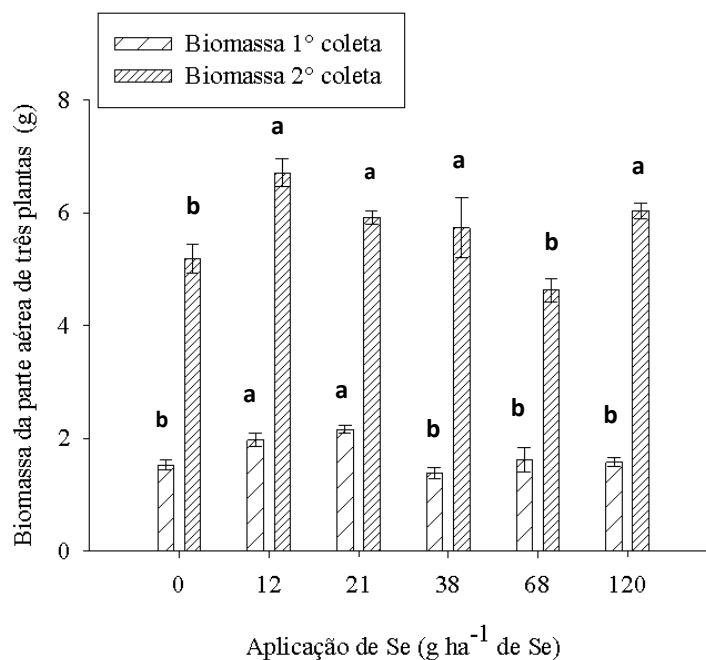
Legenda: A barra de erro representa o erro padrão das médias (n=4). Letras diferentes acima das colunas indicam diferença significativamente entre os tratamentos ao nível de 5% ($p < 0,05$) de probabilidade pelo teste Skott-Knott.

3.2 Produtividade Agronômica

A Os tratamentos com 12 e 21 g ha⁻¹ de Se na primeira coleta proporcionaram incrementos de 30 a 40% na biomassa da parte aérea, comparados com o controle (Fig. 3). Na segunda coleta, todos os tratamentos promoveram incrementos na biomassa da parte aérea, em média 20%, comparados ao tratamento controle, com exceção do tratamento 68 g ha⁻¹ de Se que não diferiu do tratamento controle (Fig. 3). Hajiboland e Sadeghzade

(2014) e Guerrero et al. (2014) também observaram incrementos na biomassa da parte aérea, quando o trigo foi suplementado com Se. O aumento na produção do trigo e incrementos na biomassa podem ser atribuídos à diminuição do estresse oxidativo (AHMAD et al., 2016), ao incremento nos teores de carboidratos (NAWAZ et al., 2014) e à maior eficiência no metabolismo de nitrogênio (RIOS et al., 2010). Neste trabalho, foram observados resultados semelhantes aos citados acima pelos autores, o que confirma a influência positiva do Se sobre o metabolismo antioxidante, do nitrogênio e dos carboidratos, além, ainda, de aumentar na taxa fotossintética líquida.

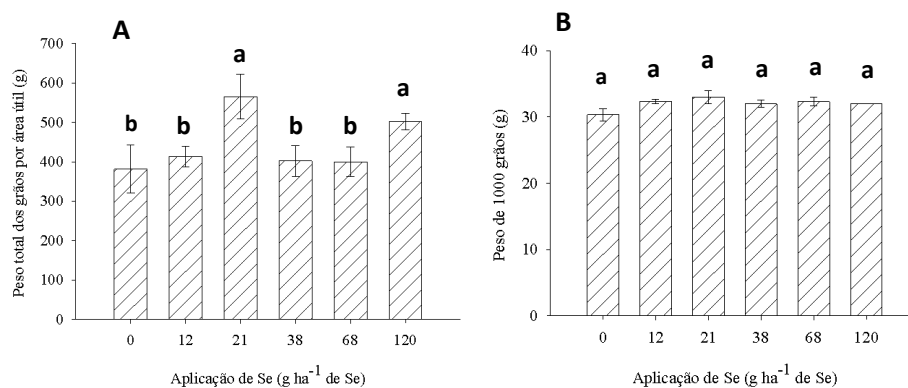
Figura 3 - Efeito da aplicação foliar de concentrações crescentes de Se, na biomassa da parte aérea das plantas de trigo coletada 14 dias após a primeira aplicação de Se (1ª coleta) e 16 dias após a segunda aplicação de Se (2ª coleta).



Legenda: A barra de erro representa o erro padrão das médias (n=8). Letras diferentes acima das colunas indicam diferença significativamente entre os tratamentos ao nível de 5% ($p < 0,05$) de probabilidade pelo teste Skott-Knott.

A produtividade do trigo foi influenciada positivamente em função da suplementação com Se. Os tratamentos com 21 e 120 g ha⁻¹ de Se proporcionaram um incremento de 48% e 31% na produção do trigo, comparados com o controle (**Fig. 4A**). O peso de 1.000 grãos (**Fig. 4B**) e a umidade dos grãos (dados não mostrados, entre 9,2 e 11,2%) não foi influenciado pelos tratamentos com Se. Os incrementos na produção de grãos corroboram com os encontrados por Nawaz et al. (2014), que observaram um incremento de 24% na produção de grãos de trigo, e por Zhang et al. (2014), que verificaram aumento da produção de grãos em arroz após a suplementação via foliar com Se. No entanto, Lyons et al. (2004) não observaram incremento na produção do trigo, independentemente do tratamento (via folha ou solo) e das concentrações de Se utilizadas. Mas, Lyons et al. (2004) relataram baixo índice pluviométrico ocorrido durante o desenvolvimento do trabalho, o que poderia ter prejudicado a produção.

Figura 4 - Efeito da aplicação foliar de concentrações crescentes de Se, na produtividade de grãos (A) e peso de 1000 grãos (B).

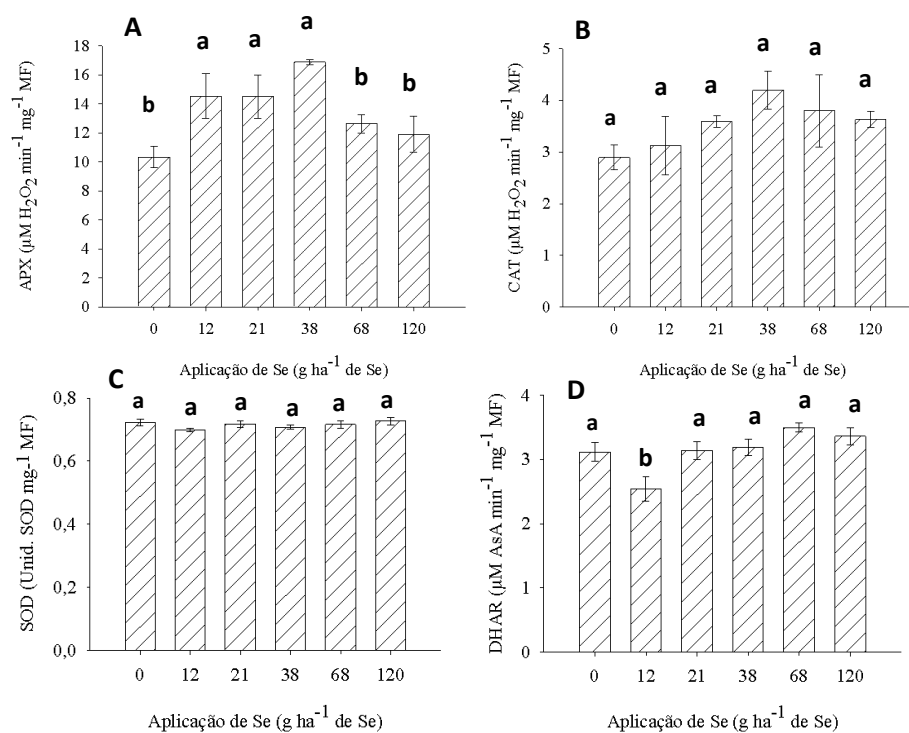


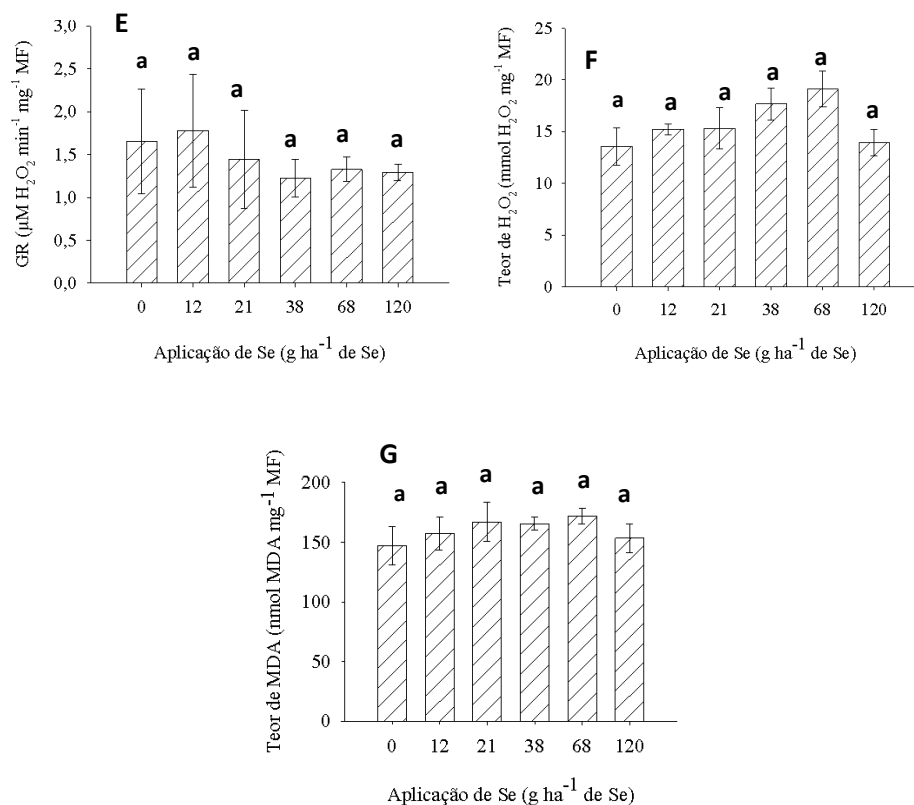
Legenda: A barra de erro representa o erro padrão das médias (n=4). Letras diferentes acima das colunas indicam diferença significativamente entre os tratamentos ao nível de 5% ($p < 0,05$) de probabilidade pelo teste Skott-Knott.

3.3 Metabolismo antioxidativo

De forma geral, a atividade da peroxidase do ascorbato (APX) foi influenciada positivamente pela presença do Se (**Fig. 5A**), porém as atividades da catalase (CAT), dismutase do íon superóxido (SOD), redutase da glutaciona (GR) e redutase do dehidroascorbato (DHAR) não apresentou sensibilidade ao Se (**Fig. B, C, D e 5E**). Além disso, não foi observado incremento nos teores de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e malonaldeído (MDA) (**Fig. F e 5G**).

Figura 5 - Efeito da aplicação foliar de concentrações crescentes de Se nas atividades enzimáticas da peroxidase do ascorbato (APX) (A); catalase (CAT) (B), dismutase do íon superóxido (SOD) (C), redutase do dehidroascorbato (DHAR) (D); redutase da glutaciona (GR) (E), nos teores de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (F) e malonaldeído (MDA) (G) nas folhas de trigo coletada 14 dias após a primeira aplicação de Se (1^a coleta).





Legenda: A barra de erro representa o erro padrão das médias (n=8). Letras diferentes acima das colunas indicam diferença significativamente entre os tratamentos ao nível de 5% ($p < 0,05$) de probabilidade pelo teste Skott-Knott.

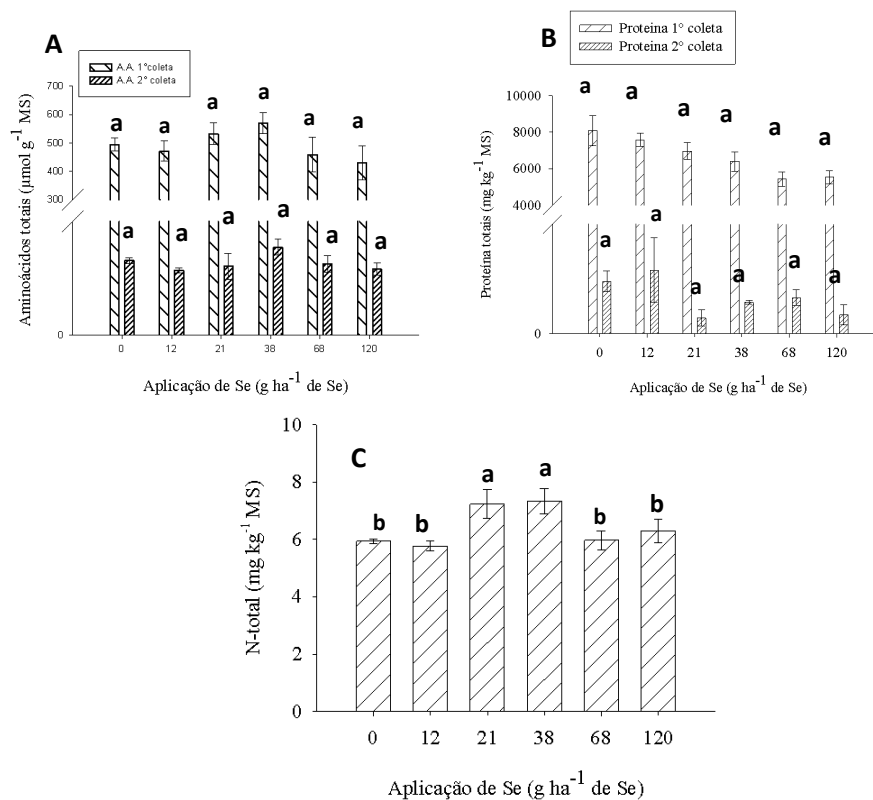
Em arroz, o fornecimento de Se levou ao aumento na atividade da APX e CAT (FENG et al., 2016; KUMAR et al., 2014), em nosso estudo observamos apenas aumento na atividade da APX. Diversos autores têm observado aumento na atividade da SOD em plantas suplementadas com Se, quando essas são submetidas aos estresses por luz (SEPPÄNEN; TURAKAINEN; HARTIKAINEN, 2003), por UV-B (YAO et al., 2011) e por déficit hídrico (WANG; XU; LIU, 2011). As enzimas APX e CAT atuam diretamente sobre o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (SHARMA et al., 2012). Assim, o aumento da

atividade dessas enzimas foi associado diretamente com o aumento no teor de H_2O_2 (FENG, WEI; TU, 2013). Porém, no presente trabalho, não foram observados incrementos nos teores de H_2O_2 (**Fig. 5F**). Assim, o aumento na atividade da APX foi decorrente da presença do Se e não pelo aumento no teor de H_2O_2 . Os teores de malonaldeído (MDA) não aumentaram na presença do Se (**Fig. 5G**), ou seja, não houve peroxidação lipídica. A maior atividade da enzima APX e a manutenção estável dos teores de MDA e H_2O_2 nas plantas tratadas com Se podem ser favoráveis ao crescimento (**Fig. 3**) e à produtividade de grãos (**Fig. 4A**), pois reduzem os danos causados pelo estresse oxidativo e mantêm a homeostase celular, o que é de fundamental importância para conservar a permeabilidade da membrana celular (AHMAD et al., 2016).

3.4 Metabolismo do nitrogênio

A suplementação das plantas de trigo com 21 e 38 g ha^{-1} de Se proporcionaram incrementos nos teores de nitrogênio total (N-total), cerca de 20%, em ambos os tratamentos, em relação ao controle (**Fig. 6C**). Estes aumentos, não promoveram incrementos nos teores de aminoácidos totais (AA) e proteínas (**Fig. A e 6B**). Possivelmente o nitrogênio (N) absorvido, ainda não havia sido assimilado, desta forma, ele se encontra nas formas inorgânicas, como nitrato, nitrito e amônio.

Figura 6 - Efeito da aplicação foliar de concentrações crescentes de Se, nos teores aminoácidos totais (A) e proteínas (B) na parte aérea das plantas de trigo coletada 14 dias após a primeira aplicação de Se (1^a coleta) e 16 dias após a segunda aplicação de Se (2^a coleta), os teores de nitrogênio total (N-total) (C) foram analisados apenas na 2^a coleta.



Legenda: A barra de erro representa o erro padrão das médias (para aminoácidos totais e proteínas n=8 e para N-total n=4). Letras diferentes acima das colunas indicam diferença significativamente entre os tratamentos ao nível de 5% ($p < 0,05$) de probabilidade pelo teste Skott-Knott.

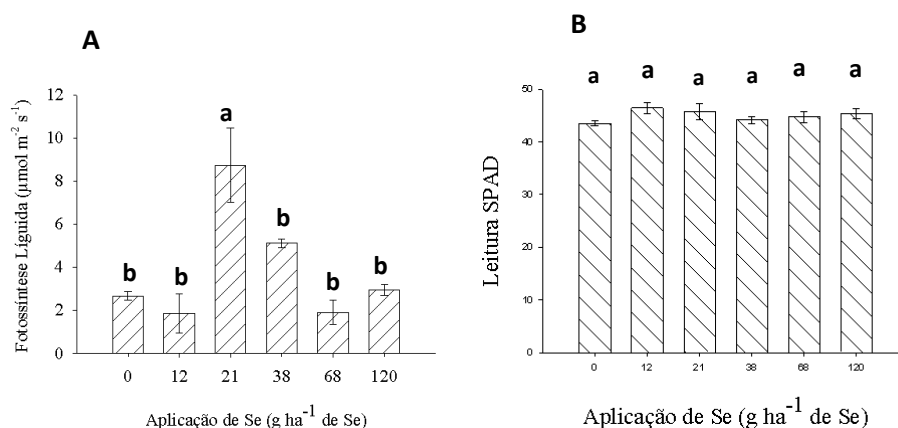
Desta forma, acredita-se que o Se possa regular de uma forma positiva o metabolismo de N, o que pode levar a uma maior absorção e assimilação de N (HAJIBOLAND; SADEGHZADE, 2014; JEŽEK et al., 2011). Isto é de fundamental importância, pois se trata do nutriente mais requisitado pelas plantas, sendo necessário em concentrações de 2% a 5% na matéria seca, para o

funcionamento metabólico normal da planta (MILLER; CRAMER, 2005). Além disso, a maior disponibilidade de N para as reações metabólicas pode propiciar grãos de trigo com teores mais elevados de aminoácidos e proteínas. A regulação do metabolismo do N foi associada ao aumento na atividade da enzima redutase do nitrato (RN) em trigo (HAJIBOLAND; SADEGHZADE, 2014) e em tabaco (XU et al., 2013). A RN é a enzima responsável por reduzir o nitrato em nitrito, ou seja, uma enzima chave no metabolismo do N (HAWKESFORD et al., 2012). Além disso, em alface observaram-se incrementos nas atividades da sintetase da glutamina, sintase do glutamato e RN após o tratamento com Se, principalmente quando a fonte era selenito (RIOS et al., 2010). Como no presente estudo, Nawaz et al. (2013) não observaram incremento no teor de proteínas totais.

3.5 Metabolismo de carboidratos e taxa fotossintética líquida

A suplementação com 21 g ha⁻¹ de Se proporcionou significativos incrementos da taxa fotossintética líquida, cerca de 120%, comparados com o controle (**Fig. 7A**). Por outro lado, não houve incrementos nas leituras com SPAD (**Fig. 7B**).

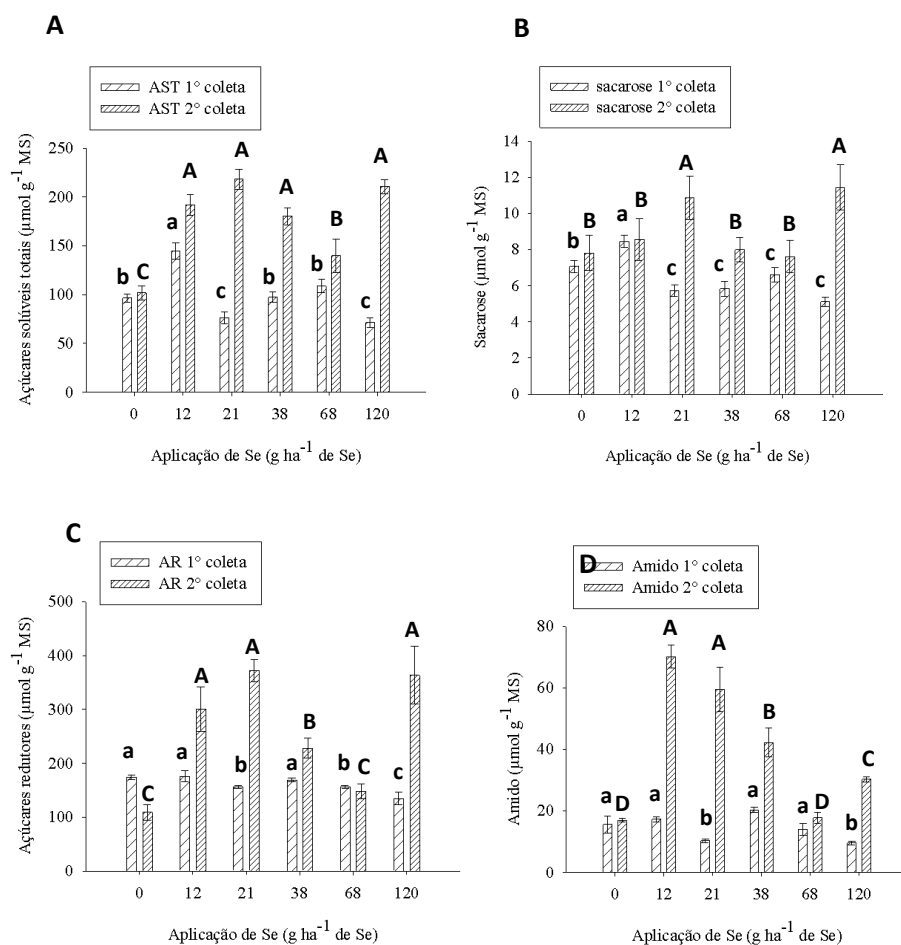
Figura 7 - Efeito da aplicação foliar de concentrações crescentes de Se, na taxa fotossintética líquida (A) e nas leituras com o SPAD (B) em plantas de trigo 14 dias após a primeira aplicação de Se (1ª coleta).



Legenda: A barra de erro representa o erro padrão das médias (n=4 para fotossíntese líquida e n= 5 para leituras com SPAD). Letras diferentes acima das colunas indicam diferença significativamente entre os tratamentos ao nível de 5% (p < 0,05) de probabilidade pelo teste Skott-Knott.

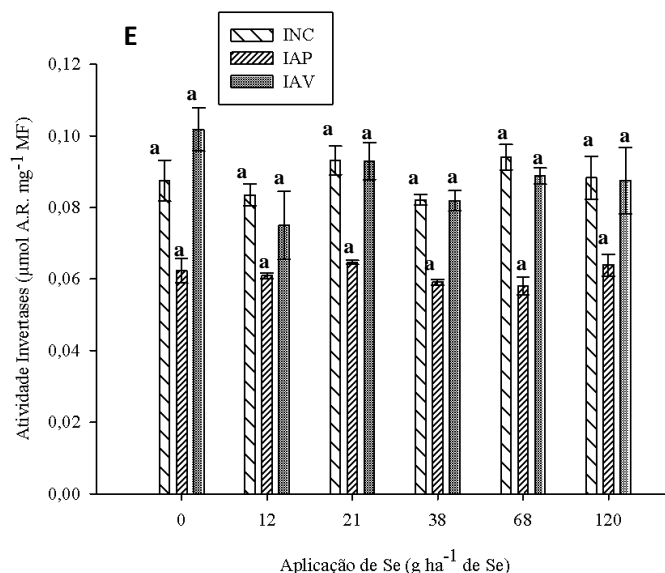
Os teores de carboidratos na primeira coleta sofreram uma leve influência do Se, uma vez que apenas o tratamento com 12 mg ha⁻¹ de Se promoveu incrementos nos teores de açúcares solúveis totais (AST) e de sacarose (**Fig. 8A e B**). No entanto, na segunda coleta, a influência do Se sobre os teores de carboidratos foi mais perceptível. Todos os tratamentos proporcionaram incrementos no teor de AST, sendo que o menor foi de 37% e o maior de 115%, proporcionados pelos tratamentos 38 e 21 g ha⁻¹ de Se, respectivamente, comparados com o controle (**Fig. 8A**). O teor de sacarose foi influenciado pelos tratamentos 21 e 120 g ha⁻¹ de Se, que promoveram incrementos de 38% e 47%, respectivamente, comparados com o controle (**Fig. 8B**). Com relação aos teores de amido e açúcares redutores (AR), apenas o tratamento 68 g ha⁻¹ de Se não influenciou positivamente estes teores (**Fig. 8C e D**). O Se, não influenciou a atividade das invertases (**Fig. 9**).

Figura 8 - Efeito da aplicação foliar de concentrações crescentes de Se, nos teores de açúcares solúveis totais (A), sacarose (B), açúcares redutores (C) e amido (D) na parte aérea das plantas de trigo coletada 14 dias após a primeira aplicação de Se (1ª coleta) e 16 dias após a segunda aplicação de Se (2ª coleta).



Legenda: A barra de erro representa o erro padrão das médias ($n=8$). Letras diferentes acima das colunas indicam diferença significativamente entre os tratamentos ao nível de 5% ($p < 0,05$) de probabilidade pelo teste Skott-Knott.

Figura 9 - Efeito da aplicação foliar de concentrações crescentes de Se, nas atividades da invertase neutra do citosol (INC), invertase ácida da parede (IAP) e invertase ácida do vacúolo (IAV) nas folhas de trigo coletada 14 dias após a primeira aplicação de Se (1ª coleta).



Legenda: A barra de erro representa o erro padrão das médias (n=4). Letras diferentes acima das colunas indicam diferença significativamente entre os tratamentos ao nível de 5% ($p < 0,05$) de probabilidade pelo teste Skott-Knott.

Neste estudo observou-se o efeito benéfico do Se sobre o metabolismo dos carboidratos: amido, AST, açúcares redutores AR e sacarose (**Fig. 8**). O efeito foi mais significativo na segunda coleta, possivelmente em função das maiores atividade metabólica (fase de enchimento de grãos) e disponibilidade de Se. O efeito benéfico do Se está de acordo com prévios estudos em trigo (NAWAZ et al., 2014), alfafa (OWUSU-SEKYERE et al., 2013) e em feijão (MALIK et al., 2010). O fornecimento de 68 g ha⁻¹ de Se proporcionou os teores de carboidratos mais semelhantes ao controle (**Fig. 8**), e isto refletiu em um acúmulo de biomassa semelhante ao controle (**Fig. 3**). O contrário também é observado, os tratamentos 12, 21 e 120 g ha⁻¹ de Se proporcionaram os maiores teores de carboidratos, comparados com o controle (**Fig. 8**), logo, esses

tratamentos apresentaram os maiores acúmulos de biomassa (**Fig. 8**). O incremento de carboidratos nas plantas tratadas com Se, possivelmente é pelo incremento na fotossíntese líquida (**Fig. 7A**), aumento no conteúdo de clorofila 'a' (OWUSU-SEKYERE et al., 2013). Além disso, é interessante analisar que, os teores de carboidratos na segunda coleta são superiores a primeira coleta dentro dos tratamentos, com exceção dos tratamentos controle e 68 g ha⁻¹ de Se, justificando, ainda mais que, as doses adequadas de Se promovem incrementos nos teores de carboidratos podendo levar a um maior crescimento e produtividade. Os incrementos nos teores de amido, sacarose e AR, de acordo com Malik et al. (2010), provavelmente, ocorram em virtude da maior atividade das enzimas do metabolismo dos carboidratos. Enfim, os aumentos nos teores de carboidratos podem refletir em maior acúmulo de biomassa (**Fig. 3**) e maior produtividade de grão (**Fig. 4A**), através da maior disponibilidade de substratos para a energia e para a formação de compostos orgânicos (MALIK et al., 2010; NAWAZ et al., 2014).

4 CONCLUSÃO

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é uma espécie indicada para realizar a biofortificação com Se, via folha, pois concentra teores adequados de Se nos grãos e não tem seu crescimento ou produtividade de grãos prejudicados. A suplementação com 21 g ha⁻¹ de Se promoveu aumento na taxa fotossintética, o que influenciou positivamente o metabolismo dos carboidratos, através do aumento nos teores de amido, açúcares solúveis totais, açúcares redutores e sacarose. Além disso, promoveu benefício ao metabolismo do nitrogênio, principalmente pelo incremento no teor de N-total, e ao metabolismo antioxidativo pelo incremento nas atividades da peroxidase do ascorbato.

REFERÊNCIAS

AHMAD, R. et al. Selenium (Se) improves drought tolerance in crop plants – a myth or fact? **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 96, n. 2, p. 372-380, Jan. 2016.

BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 116, n. 2, p. 651-658, Feb. 1998.

BOLDRIN, P. F. et al. Selenium promotes sulfur accumulation and plant growth in wheat (*Triticum aestivum*). **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, May 2016. Epub.

BOLDRIN, P. F. et al. Soil and foliar application of selenium in rice biofortification. **Journal of Food Composition and Analysis**, [New York], v. 31, n. 2, p. 238-244, Sept. 2013.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, May 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Trigo**. [201-]. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/trigo>>. Acesso 30 abr. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, New York, v. 52, p. 302-310, Jan. 1978.

CAKMAK, I.; STRBAC, D.; MARSCHNER, H. Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds. **Journal Of Experimental Botany**, Oxford, v. 44, n. 1, p. 127-132, 1993.

COCKING, E. C., YEMM, E. W. Estimation of amino acids by ninhydrin. **Biochemistry Journal**, [S.l.], v. 58, p. 7-8, Jun. 1954.

COMBS, G. F. J. Food system-based approaches to improving micronutrient nutrition: the case for selenium. **Biofactors**, [S.l.], v. 12, n. 1/4, p. 39-43, 2000.

DISCHE, Z. General color reactions. In: WHISTLER, R. L.; WOLFRAM, M. L. **Carbohydrate chemistry**. New York: Academic, 1962. p. 477-520.

DUCSAY, L.; LOŽEK, O. Effect of selenium foliar application on its content in winter wheat grain. **Plant, Soil and Environment**, Slezská, v. 52, n. 2, p. 78-82, Feb. 2006.

FENECH, M. et al. Selenium biofortified wheat. In: PREEDY, V. R.; SRIRAJASKANTHAN, R.; PATEL, V. B. (Ed). **Handbook of food fortification and health**. New York: Humana Press, 2013. cap. 27. p. 349-356.

FENG, R. et al. Responses of root growth and antioxidative systems of paddy rice exposed to antimony and selenium. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 122, p. 29-38, Feb. 2016.

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

GALINHA, C. et al. Characterization of selenium-enriched wheat by agronomic biofortification. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 52, n. 7, p. 4236-4245, July 2015.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I., occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 59, n. 2, p. 309-314, Feb. 1977.

GUERRERO, B. et al. Dual effects of different selenium species on wheat. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 83, p. 300-307, Oct. 2014.

HAJIBOLAND, R.; SADEGHZADE, N. Effect of selenium on CO₂ and NO₃⁻ assimilation under low and adequate nitrogen supply in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Photosynthetica**, Prague, v. 4, n. 4, p. 501-510, Dec. 2014.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 84, n. 2, p. 450-455, Jun. 1987.

HAWKESFORD, M. et al. Functions of macronutrients. In: MARSCHNER, P. (Ed.). **Mineral nutrition of higher plants**. 3rd. ed. Amsterdam: Academic Press, 2012. p. 171-178.

HAWKESFORD, M. J.; ZHAO, FANG-JIE. Strategies for increasing the selenium content of wheat. **Journal of Cereal Science**, London, v. 46, n. 3, p. 282-292, Nov. 2007.

JEŽEK, P. et al. Effect of foliar application of selenium on the content of selected amino acids in potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). **Plant, Soil and Environment**, Slezská, v. 57, n. 7, p. 315-320, 2011.

KAUR, N. et al. Selenium in agriculture: a nutrient or contaminant for crops? **Archives of Agronomy and Soil Science**, [Abingdon], v. 60, n. 12, p. 1593-1624, May 2014.

KUMAR, A. et al. Selenium ameliorates arsenic induced oxidative stress through modulation of antioxidant enzymes and thiols in rice (*Oryza sativa* L.). **Ecotoxicology**, [S.l.], v. 23, n. 7, p. 1153-1163, Sept. 2014.

LYONS, G. H. et al. High-selenium wheat: Agronomic biofortification strategies to improve human nutrition. **Food, Agriculture and Environment**, Helsinki, v. 2, n. 1, p. 171-178, 2004.

LYONS, G. H. et al. Selenium distribution in wheat grain, and the effect of postharvest processing on wheat selenium content. **Biological Trace Element Research**, Clifton, v. 103, p. 155-158, 2005.

LYONS, G. H. et al. Selenium increases seed production in Brassica. **Plant and Soil**, The Hague, v. 318, n. 1, p. 73-80, May 2009.

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

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e perspectivas**. 2. ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997.

MALIK, J. A. et al. Promotion of Growth in Mungbean (*Phaseolus aureus* Roxb.) by Selenium is Associated with Stimulation of Carbohydrate Metabolism. **Biological Trace Element Research**, Clifton, v. 143, p. 530-539, 2011.

MALIK, J. A. et al. Selenium antagonises the toxic effects of arsenic on mungbean (*Phaseolus aureus* Roxb.) plants by restricting its uptake and

enhancing the antioxidative and detoxification mechanisms. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 77, p. 242-248, Apr. 2012.

MILLER, A. J.; CRAMER, M. D. Root nitrogen acquisition and assimilation. *Root Physiology: from Gene to Function*. **Plant Ecophysiology**, [New York], v. 4, p. 1-36, 2005.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, [S.l.], v. 31, n. 3, p. 426-428, Mar. 1959.

MORA, M. L. et al. Improving selenium status in plant nutrition and quality. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Temuco, v.15, n. 2, p. 486-503, June 2015.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

NAWAZ, F. et al. Selenium (Se) regulates seedling growth in wheat under drought stress. **Advances in Chemistry**, Cairo, v. 2014, p. 1-8, Aug. 2014.

NAWAZ, F. et al. Selenium (Se) seed priming induced growth and biochemical changes in wheat under water deficit conditions. **Biological Trace Element Research**, Clifton, v. 151, p. 284-293, 2013.

NAWAZ, F. et al. Supplemental selenium improves wheat grain yield and quality through alterations in biochemical processes under normal and water deficit conditions. **Food Chemistry**, London, v. 175, p. 350-357, May 2015

OWUSU-SEKYERE, A. et al. Influence of selenium (Se) on carbohydrate metabolism, nodulation and growth in alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Plant and Soil**, The Hague, v. 373, n.1, p. 541-552, Dec. 2013.

PILON-SMITS, E. A. H.; QUINN, C. F. Selenium Metabolism in Plants. **Cell Biology of Metals and Nutrients**, [New York], v. 17, p. 225-241, 2010.

POBLACIONES, M. J. et al. Agronomic selenium biofortification in *Triticum durum* under Mediterranean conditions: From grain to cooked pasta. **Food Chemistry**, London, v. 146, p. 378-384, Mar. 2014.

RAMOS, S. J. et al. Selenium biofortification and antioxidant activity in lettuce plants fed with selenate and selenite. **Plant, Soil and Environment**, Slezská, v. 56, n. 12, p. 584-588, Dec. 2009.

RAYMAN, M. P. Selenium and human health. **The Lancet**, London, v. 379, n. 9822, p. 1256-1268, Mar. 2012.

RENKEMA, H. et al. The effect of transpiration on selenium uptake and mobility in durum wheat and spring canola. **Plant and Soil**, The Hague, v. 354, p. 239-250, 2012.

RIOS, J. J. et al. Nitrogen-use efficiency in relation to different forms and application rates of Se in lettuce plants. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 29, n. 2, p. 164-170, June 2010.

SEPPÄNEN, M.; TURAKAINEN, M.; HARTIKAINEN, H. Selenium effects on oxidative stress in potato. **Plant Science**, Limerick, v. 165, n. 2, p. 311-319, Aug. 2003.

SHARMA, P. et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, London, v. 2012, p. 1-26, 2012.

SHARMA, S. et al. Comparative effects of selenate and selenite on growth and biochemical composition of rapeseed (*Brassica napus* L.). **Plant and Soil**, The Hague, v. 329, n. 1, p. 339-348, Apr. 2010.

TERRY, N. et al. Selenium in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 51, p. 401-432, 2000.

THOMSON, C. D. Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 58, n. 3, p. 391-402, Mar. 2004.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, Limerick, v. 151, n. 1, p. 59-66, Feb. 2000.

WANG, C. Q.; XU, H. J.; LIU, T. Effect of selenium on ascorbate-glutathione metabolism during peg-induced water deficit in *Trifolium repens* L. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 30, n. 4, p. 436-444, Dec. 2011.

WHANGER, P. D. Selenocompounds in plants and animals and their biological significance. **Journal of the American College Nutrition**, Clearwater, v. 21, n. 3, p. 223-232, June 2002.

XU, Z. C. et al. Effects of different selenium concentrations on invertase and nitrate reductase activities of flue-cured tobacco. **Food Agriculture and Environment**, Helsinki, v. 11, n. 3-4, p. 964-967, 2013.

YAO, X. et al. Protective role of selenium in wheat seedlings subjected to enhanced UV-B radiation. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v. 58, n. 2, p. 283-289, Mar. 2011.

ZENG, Y. et al. Rapid repression of maize invertases by low oxygen: invertase/sucrose synthase balance, sugar signaling potential, and seedling survival. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 121, n. 2, p. 599-608, Oct. 1999.

ZHANG, M. et al. 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, Nov. 2014.

**ARTIGO 2 - METABOLISMO DE CARBOIDRATOS E SISTEMA
ANTIOXIDANTE EM PLANTAS DE TRIGO BIOFORTIFICADAS COM
SELÊNIO APLICADO VIA SOLO**

Artigo formatado de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2003).

RESUMO

A ingestão diária de Se pelos humanos é fundamental para o bom funcionamento fisiológico do corpo. Além disso, um suprimento adequado de Se pode também acarretar em benefícios para as plantas. A biofortificação agronômica é uma técnica que busca aumentar os teores de Se em partes comestíveis dos vegetais e, por consequência, nos animais que delas se alimentam. Objetivou-se com este estudo: i) verificar a eficiência do trigo, como uma espécie indicada para ser utilizada na técnica de biofortificação com Se suprido via solo; e ii) estudar a influência do Se aplicado via solo no metabolismo dos carboidratos, de aminoácidos e na atividade do sistema antioxidante em plantas de trigo. A disponibilização do Se foi feita via solo, através da aplicação ao solo, de diferentes doses de selênio (12, 21, 38, 68 e 120 g ha⁻¹ de Se), como selenato de sódio (Na₂SeO₄). O tratamento com 120 g ha⁻¹ de Se proporcionou concentrações de 7,98 mg kg⁻¹ de Se nas folhas e 2,27 mg kg⁻¹ de Se nos grãos. O tratamento com 38 g ha⁻¹ de Se promoveu incrementos de cerca de 50% nos teores de açúcares solúveis totais, de 17% nos açúcares redutores e de 53% na sacarose, quando comparados, com o tratamento controle. Os tratamentos com 12, 68 e 120 g ha⁻¹ de Se aumentaram significativamente a atividades da catalase. Além disso, o Se aumentou os teores de carboidratos e de aminoácidos totais livres. Estes resultados indicam que o trigo é uma planta indicada para a técnica de biofortificação agronômica com Se via solo e este elemento é benéfico às plantas de trigo.

Palavras-chave: Selenato. Biofortificação agronômica. Campo. Trigo. Crescimento.

**Metabolism of carbohydrates and antioxidant system in wheat plants
biofortified with selenium applied via soil**

ABSTRACT

Daily ingestion of Se by humans is fundamental for the proper functioning of the body. An adequate supply of Se can also benefit plants. Agronomic biofortification is a technique that seeks to increase the contents of Se in edible parts of vegetables and, consequently, in animals that feed off them. With this study, we aimed at: i) verifying the efficiency of wheat as species indicated for use in the biofortification technique with Se supplied via soil; and, ii) study the influence of Se applied via soil over the metabolism of carbohydrates and amino acids, as well as over the activity of the antioxidant system in wheat plants. The availability of Se was done via soil, by means of soil application of different doses of selenium (12, 21, 38, 68 and 120 g ha⁻¹ of Se), in the form of sodium selenate (Na₂SeO₄). The treatment with 120 g ha⁻¹ of Se promoted concentrations of 7.98 mg kg⁻¹ of Se in the leaves and of 2.27 mg kg⁻¹ of Se in the grains. The treatment with 38 g ha⁻¹ of Se promoted increments of close to 50% in the contents of total soluble sugars, of 17% in reducing sugars and of 53% in sucrose, when compared with the control treatment. The treatments with 12, 68 and 120 g ha⁻¹ of Se significantly increased catalase activity. Selenium also increased the contents of carbohydrates and total free amino acids. These results indicate that wheat is a plant indicated for the agronomic biofortification technique with Se via soil, and that this element is beneficial to wheat plants.

Keywords: Selenate. Agronomic biofortification. Field. Wheat. Growth.

1 INTRODUÇÃO

O selênio é um elemento essencial para humanos e animais (RAYMAN, 2012), além de ser um elemento benéfico para as plantas (PILON-SMITS; QUINN, 2010). Esse elemento em animais e humanos é componente de 30 selenoproteínas, como a peroxidase da glutathione, redutase da tioredoxina, iodotironina deiodinase, entre outras (RAYMAN, 2012; THOMSON, 2004). Essas enzimas estão relacionadas à proteção contra o estresse oxidativo, manutenção do estado redox e imunológico, além de influenciar a produção do hormônio tireoidiano e funções anti-inflamatórias (REEVES; HOFFMANN, 2009).

Devido à essencialidade do Se aos humanos, existem recomendações diárias de ingestão de Se, que são de 60 e 70 $\mu\text{g dia}^{-1}$ para mulheres e homens, respectivamente (KIPP et al., 2015). No entanto, estima-se que um bilhão de pessoas ao redor do mundo estão deficientes em Se (MORA et al., 2015). Desta forma, técnicas como a biofortificação de plantas (genética e/ou agrônômica) constituem-se de uma solução para suplementar a alimentação humana com Se (HAWKESFORD; ZHAO, 2007). Na biofortificação agrônômica, o elemento é disponibilizado para ser absorvido e assimilado pela planta, sendo, posteriormente, incluído na dieta de humanos e animais.

A técnica de biofortificação tem sido aplicada para o trigo, que é o segundo cereal mais cultivado mundialmente (BRASIL, 2011), sendo utilizado como matéria-prima para a produção de pães, massas, farinhas e bolos (LYONS et al., 2003). O trigo é uma planta não acumuladora de Se, porém, pode apresentar aumento nas concentrações desse elemento nos grãos e nas folhas em decorrência do fornecimento solo e, ou, foliar (LYONS et al., 2004).

A suplementação com Se tem sido descrita como benéfica às plantas, podendo aumentar o crescimento e a produção de algumas espécies (NAWAZ et al., 2015). No entanto, os mecanismos de estímulo do Se sobre o crescimento e à

produção proveniente dos vegetais, ainda não estão totalmente compreendidos (MALIK et al., 2011). A complementação da adubação básica com Se pode atenuar os efeitos causados por estresses abióticos pela presença de Cd (Kumar et al., 2012), altas temperaturas (DJANAGUIRAMAN; PRASAD; SEPPANEN, 2010; HASANUZZAMAN et al., 2014), radiação UV-B (Yao et al., 2011), baixas temperaturas (CHU; YAO; ZHANG, 2010) e estresse hídrico (HASANUZZAMAN; HOSSAIN; FUJITA, 2011). Os benefícios do Se têm sido atribuídos à sua atuação na manutenção da homeostase celular pela maior eficiência do sistema antioxidante e diminuição do estresse oxidativo (FENG; WEI, 2012; HASANUZZAMAN; HOSSAIN; FUJITA, 2010). Além disso, o Se tem papel na regulação das atividades das enzimas do metabolismo dos carboidratos e do nitrogênio, aumentando a taxa fotossintética e a eficiência da etapa fotoquímica do fotossistema II, proporcionando maior crescimento das plantas (DIAO et al., 2014; MALIK et al., 2011; RIOS et al., 2010).

Apesar dos estudos recentes, até o momento são escassos trabalhos em campo demonstrando a eficiência da biofortificação com Se em trigo e a influência desse elemento no metabolismo vegetal de forma integrada. Neste sentido, objetivou-se, com este trabalho: i) verificar a eficiência do trigo, como uma espécie indicada para ser utilizada na técnica de biofortificação com Se suprido via solo; e ii) estudar a influência do Se aplicado via solo no metabolismo dos carboidratos, de aminoácidos e na atividade do sistema antioxidante em plantas de trigo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Instalação do experimento

O ensaio foi conduzido na fazenda experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), em Lambari, MG. Aproximadamente, 30 dias antes do plantio foi realizada a calagem com 4 t ha⁻¹ e o índice de saturação de base foi elevado a 50%. O plantio do trigo (*Triticum aestivum* L), variedade BRS 264, foi realizado dia 25/05/2015 com adubação básica de 300 kg ha⁻¹ de fertilizante 8-28-16 (N-P₂O₅-K₂O), sendo que a adubação de cobertura ocorreu no dia 22/06/2015, com 170 kg ha⁻¹ de 20-00-20. Os atributos químicos e granulométricos do solo onde o experimento foi instalado encontram-se nas **Tabelas 1, 2 e 3**, respectivamente. A precipitação total foi de 236 mm e as temperaturas mínimas e máximas foram de 3°C e 34°C, respectivamente.

Tabela 1 - Atributos químicos do solo utilizado no cultivo do trigo.

	K	P	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	t	T	V	m
pH	--mg dm ⁻³ --		-----cmol dm ⁻³ -----				-----cmolc dm ⁻³ -----			----%----	
5,1	62,0	17,5	1,3	0,3	0,8	7,8	1,7	2,5	9,6	18,2	31,2

pH em água, KCl e CaCl= Relação 1:2:5; Ca, Mg e Al Extrator KCl (1 mol L⁻¹); H + Al= Extrator: SMP; SB= Soma de bases trocáveis; CTC (t)= Capacidade de trocas catiônicas efetiva; CTC (T)= Capacidade de trocas catiônicas a pH= 7; V= Índice de saturação por base;; B- Extrator água quente; m= índice de saturação de Alumínio.

Tabela 2 - Atributos químicos do solo utilizado no cultivo do trigo.

M.O.	P-Rem	Zn	Fe	Mn	Cu	B	S
dag kg ⁻¹	-----mg L ⁻¹ -----		-----mg dm ⁻³ -----				
3,8	4,8	2,3	28,2	8,4	1,2	0,10	22,4

M.O. = Matéria orgânica- Na₂Cr₂O₇ 4N+ HeSO₄ 10N; P-rem= Fosforo remanescente; P, K, Fe, Zn, Mn e Cu Extrator Mehlich; B Extrator água quente.

Tabela 3 - Análise granulométrica do solo utilizado no cultivo do trigo.

Classificação do solo	Argila	Silte	Areia
	-----dag kg ⁻¹ -----		
	42	19	39

A adubação com Se via solo (solo) ocorreu no dia 30/06/2015, em diferentes concentrações de Se: 12; 21; 38; 68 e 120 g ha⁻¹ de Se. A fonte utilizada para incorporar o Se foi o selenato de sódio (Na₂SeO₄), o qual foi diluído em 2 litros de água deionizada. A aplicação das diferentes doses de Se foi sobre a linha de cultivo, a cerca de 5 cm da linha de plantio. As soluções foram aplicadas em todas as linhas das parcelas, através de uma bomba pressurizada com contêiner de dióxido de carbono acoplado, o que permitiu uma aplicação uniforme dos tratamentos.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados, com quatro repetições. As parcelas deste experimento foram de 10 m², ou seja, cinco metros de comprimento por dois metros de largura, o espaçamento entre linha foi de 0,17 m totalizando doze linhas de plantio por parcela. A área útil foi de 5,5 m², ou seja, 4 m de comprimento por 1,36 m de largura que representa oito linhas. O controle recebeu apenas 2 litros de água deionizada. Assim, cinco tratamentos mais o tratamento controle, totalizaram vinte e quatro parcelas.

2.2 Análises agronômicas e fisiológicas

A seguir, estão descritas as metodologias empregadas para analisar as variáveis fisiológicas: quantificação dos teores de carboidratos, proteínas, peróxido de hidrogênio, malonaldeído, das atividades de algumas enzimas do sistema antioxidante e das invertases, além de quantificar os teores totais de aminoácidos, selênio, nitrogênio e enxofre. Para as análises *in vitro* e da fotossíntese utilizou-se apenas a folha bandeira, enquanto que, para o restante das análises, o material foi oriundo da quantificação da massa seca da parte

aérea, excluindo apenas as panículas existentes. As análises agronômicas avaliadas foram: quantificação de biomassa da parte aérea, produtividade de grãos, grau de umidade e peso de 1000 grãos. Todas as coletas de folhas para as análises foram retiradas da área útil aos 14 dias após a adubação com Se.

2.2.1 Quantificação da biomassa da parte aérea e dos teores de carboidratos, proteínas e aminoácidos totais

Para a quantificação de biomassa da parte aérea foram coletadas seis plantas por parcela, sendo estas divididas em duas repetições de três plantas. Os materiais coletados foram secos em estufa com circulação forçada de ar a uma temperatura próxima a 60 °C, até peso constante. Posteriormente, as repetições com três plantas foram pesadas em balança analítica com precisão de 0,01 g. Deste material, foram retiradas amostras de 0,2 g de cada tratamento para determinar os teores de amido, sacarose e açúcares solúveis totais (AST) utilizando o método da Antrona (DISCHE, 1962) e, para os açúcares redutores (AR) o protocolo descrito por Miller (1959) através do método DNS e aminoácidos livres totais (COCKING; YEMM, 1954). O teor de proteína foi determinado de acordo com Bradford (1976).

2.2.2 Leituras com o SPAD

As leituras de SPAD foram obtidas através da média de cinco leituras, realizadas na região mediada das folhas completamente expandidas e intactas, utilizando o medidor portátil de clorofila SPAD-502 (Konica Minolta, Japão). Através das leituras do SPAD, pode-se inferir o conteúdo de clorofila total presente nas folhas.

2.2.3 Análises de selênio (Se) e enxofre (S) na parte aérea e nos grãos

O material para a quantificação de Se e S na parte aérea foi proveniente do material utilizado para a quantificação da biomassa da parte aérea, durante a

moagem foi retirados às panículas do trigo. O material para a quantificação de Se e S nos grãos foi coletado após a pesagem da produtividade de grãos. Os extratos para as quantificações de Se e S foram oriundos da digestão ácida de 0,5 g e 0,2 g de cada material, respectivamente, em blocos digestores. Para a digestão, foram adicionados 6 mL de uma mistura composta por ácido nítrico e perclórico na proporção 2:1 (v/v), sendo as amostras deixadas em repouso à temperatura ambiente, *overnight* e após, levadas a blocos digestores a 200°C durante 2 horas. Após a digestão completa, foram adicionados 10 mL de água destilada aos extratos. As determinações de Se e S foram realizadas utilizando-se um espectrofotômetro de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS). Ressalta-se que, juntamente com as amostras, o procedimento foi também realizado em padrão de referência certificado (BCR[®]-414 Plankton) visando demonstrar a confiabilidade nas determinações de Se.

2.2.4 Análise do teor de nitrogênio total na parte aérea

O material para a quantificação de nitrogênio foliar foi proveniente da massa seca obtida a partir da segunda época de coleta. O teor de N total foi determinado pela digestão sulfúrica e destilação Kjeldhal (MALAVOLTA et al., 1997).

2.2.5 Produtividade de grãos

A análise de produtividade de grãos foi feita através da colheita e pesagem da área útil em cada parcela, sendo a colheita realizada manualmente. O peso de 1.000 grãos e o grau de umidade foi determinado de acordo com a Regra de Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

2.2.6 Enzimas antioxidantes

O extrato enzimático foi obtido pela maceração em nitrogênio líquido de 0,2 g de folhas de massa fresca. Foram adicionados ao extrato enzimático 1,5

mL do tampão de extração contendo: tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,8), EDTA 0,1 M (pH 7,0), DTT 0,5 M, PMSF 0,1 M, ácido ascórbico 0,001 M e 22 mg de PVPP. O extrato foi centrifugado a 14.000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C durante o período das análises. Os sobrenadantes coletados foram utilizados nas análises enzimáticas da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), redutase da glutathione (GR) e redutase do dehidroascorbato (BIEMELT et al., 1998), conforme relatado a seguir. Para as análises foram utilizadas triplicatas e as leituras realizadas em espectrometria com placa de Elisa.

2.2.6.1 Dismutase do superóxido (SOD)

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977) em um meio de incubação composto por fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, metionina 14 mM, EDTA 0,1 μM, NBT 75 μM e riboflavina 2 μM. Os tubos, com o meio de reação e a amostra, foram iluminados por 7 minutos com uma lâmpada fluorescente de 20W. Para o controle, o mesmo meio de reação sem a amostra foi iluminado. O branco foi mantido no escuro. As leituras foram realizadas a 560 nm e o cálculo da enzima foi feito com a seguinte equação: % de inibição = $(A_{560} \text{ amostra com extrato enzimático} - A_{560} \text{ controle sem enzima}) / (A_{560} \text{ controle sem enzima})$. Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições do ensaio.

2.2.6.2 Catalase (CAT)

A CAT foi avaliada segundo Havir e McHale (1987). A alíquota do extrato enzimático foi adicionada ao meio de incubação contendo fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0) e peróxido de hidrogênio 12,5 mM, incubado a 28°C. A atividade dessa enzima foi determinada pelo decréscimo na absorbância a 240

nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos, monitorado pelo consumo de peróxido de hidrogênio. O coeficiente de extinção molar utilizado foi de 36 mM cm^{-1} .

2.2.6.3 Peroxidase do ascorbato (APX)

A atividade da APX foi determinada pelo acompanhamento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos. O tampão de incubação foi composto por fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), ácido ascórbico 0,5 mM e peróxido de hidrogênio 0,1 mM (NAKANO; ASADA, 1981). O coeficiente de extinção molar utilizado foi de $2,8 \text{ mM cm}^{-1}$.

2.2.6.4 Redutase do dehidroascorbato (DHAR)

A atividade da DHAR foi realizada segundo Nakano e Asada (1981), em que o tampão de incubação composto por fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, glutathiona reduzida 2,5 mM, dehidroascorbato (DHA) 0,8 mM e EDTA 0,1 mM foi colocado em banho-maria, a 35°C, e a leitura realizada a 265 nm, observando-se o aumento na absorbância, que indica a formação de ascorbato (NAKANO; ASADA, 1981).

2.2.6.5 Redutase da glutathiona (GR)

A atividade da GR foi determinado segundo Cakmak, Strbac e Marschner (1993), monitorando-se a taxa de oxidação do NADPH por meio do decréscimo na absorbância a 340 nm por 3 minutos. O meio de incubação foi composto de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,8, glutathiona oxidada 1 mM e NADPH 75 μM .

2.2.7 Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

O extrato enzimático foi obtido pela maceração em nitrogênio líquido de 0,2 g de folhas, estas foram homogeneizadas em 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) e centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos, a 4°C. O H_2O_2 foi determinado medindo-se a absorbância a 390 nm em um meio de reação

contendo tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, 500 µL do extrato e 1 mL de iodeto de potássio (VELIKOVA; YORDANOV; EDREVA, 2000).

2.2.8 Peroxidação lipídica (MDA)

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, conforme descrito por Buege e Aust (1978). Assim, 0,2 g de folhas que foram macerados em N₂ líquido acrescido de 20% de polivinilpirrolidona (m/v) e homogeneizados em ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g, por 10 minutos. Alíquotas do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação (0,5% (m/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 10% (m/v) de TCA, incubando-se, em seguida, a 95 °C, por 30 minutos. A reação foi paralisada por resfriamento rápido em gelo e as leituras foram determinadas em espectrofotômetro, a 535 nm e 600 nm. O TBA forma complexos de cor avermelhada, com aldeídos de baixa massa molecular, como o malondialdeído (MDA), produto secundário do processo de peroxidação. A concentração do complexo MDA/TBA foi calculada pela seguinte equação: $[MDA] = (A_{535} - A_{600})/(\epsilon \cdot b)$, em que: ϵ (coeficiente de extinção = $1,56 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$); b (comprimento ótico = 1). A peroxidação foi expressa em nmol de MDA mg⁻¹ de matéria fresca.

2.2.9 Enzimas invertase neutra do citosol (INC) e invertase ácida do vacúolo (IAV)

A extração e a incubação das invertases solúveis, invertase neutra do citosol (INC) e invertase ácida do vacúolo (IAV) foram realizadas conforme descrito por Zeng et al. (1999). O extrato enzimático foi obtido pela maceração em nitrogênio líquido de 0,5 g de folhas, homogenizadas em 2 mL do tampão de extração contendo HEPES 200 mM, pH 7,5, PMSF 1 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 1 mM e ácido ascórbico 50 mM, seguida pela centrifugação a 18.000 g, por 20

minutos, a 4°C. O sobrenadante foi coletado e acrescido ao meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5 para a INC e em tampão citrato de sódio 200 mM, pH 4,5 para a IAV, além de MgCl₂ 5 mM e sacarose 200 mM em ambos os meios de reações. A incubação foi realizada em banho-maria, a 30 °C, por 40 minutos. Os açúcares redutores formados foram quantificados pelo método do DNS (MILLER, 1959).

2.2.10 Enzima invertase ácida da parede (IAP)

A extração e a incubação da invertase ácida da parede foram realizadas conforme descrito por Zeng et al. (1999). A extração foi realizada por meio da ressuspensão do *pellet* resultante da centrifugação para a quantificação das invertases solúveis. Utilizou-se 2 mL do tampão de extração contendo tampão citrato de sódio 200 mM, PMSF 1 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 1 mM, ácido ascórbico 50 mM e NaCl 1M, seguida pela centrifugação a 18.000 g, por 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi coletado e acrescido ao meio de reação contendo tampão citrato de sódio 200 mM, MgCl₂ 5 mM e sacarose 200 mM. A incubação foi realizada em banho-maria, a 30 °C, por 40 minutos. Os açúcares redutores formados foram quantificados pelo método do DNS (MILLER, 1959).

2.3 Análise estatística

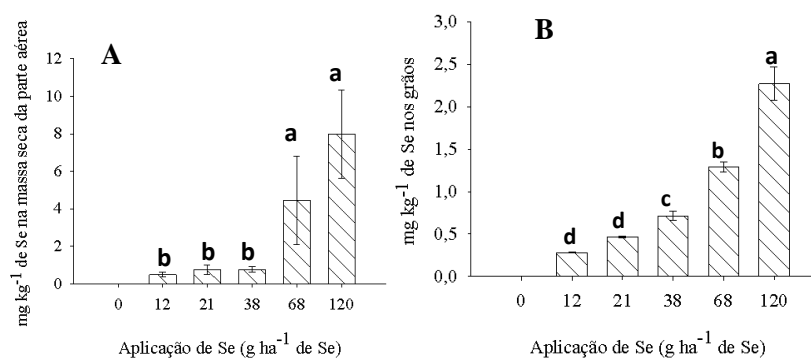
Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade e à análise de variância, sendo as médias submetidas ao teste de Skot-Knot ($p < 0,05$). Os gráficos foram feitos usando o Programa Sigma Plot (versão 12.5, Systat Software Chicago, IL, USA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Teor de selênio (Se) e enxofre (S) nas folhas e nos grãos de trigo

A média da concentração de Se no material padrão de referência Plankton (BCR[®]-414 Plankton) foi de 1,75 mg kg⁻¹ de Se, enquanto o valor certificado de Se no material é de 1,332 mg kg⁻¹ de Se. Assim, a recuperação nas amostras certificadas (média de recuperação 76%) teve uma precisão de dados analíticos confiáveis para análise de Se. Os teores de Se nas folhas e nos grãos de trigo aumentaram significativamente quando as plantas foram submetidas às crescentes doses de Se no solo. As maiores concentrações foram de 7,98 mg kg⁻¹ de Se na parte aérea e 2,27 mg Se kg⁻¹ nos grãos, proveniente do tratamento com 120 g ha⁻¹ de Se (**Fig. 1 A e B**).

Figura 1 - Efeito da aplicação via solo de concentrações crescentes de Se, nos teores de Se na parte aérea das plantas (A) e nos grãos (B) de trigo.



Legenda: A barra de erro representa o erro padrão das médias (n=4). Letras diferentes acima das colunas indicam diferença significativamente entre os tratamentos ao nível de 5% ($p < 0,05$) de probabilidade pelo teste Skott-Knott.

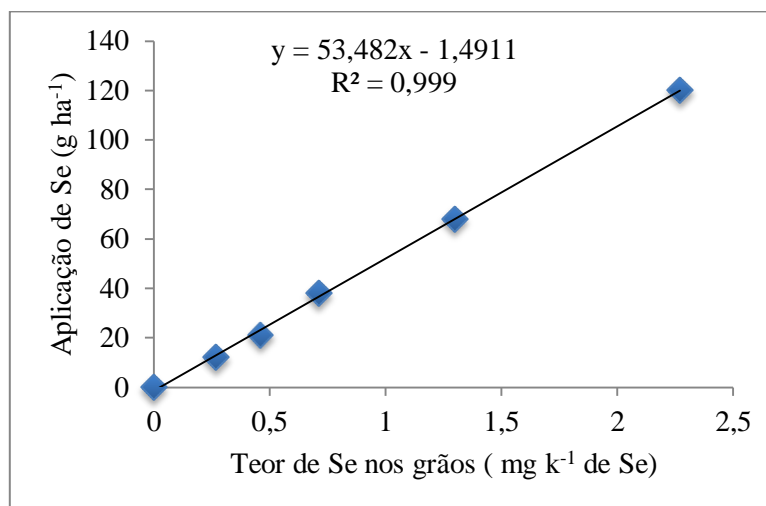
Neste estudo, o fornecimento da maior dose de Se proporcionou teores quase o dobro daqueles apresentados por Keskinen, Turakainen e Hartikainen (2010) e Lyons et al. (2005), que foram de 4 mg e 3,1 mg kg⁻¹ de Se na parte

aérea, respectivamente. Em ambos os trabalhos, os autores utilizaram 100 g ha^{-1} de Se, porém o primeiro utilizou solo com textura arenosa e o segundo, solo com textura argilosa, a mesma textura do solo utilizado em nosso estudo. Nos grãos, observa-se o teor de $2,27 \text{ mg Se kg}^{-1}$, após o tratamento com 120 g ha^{-1} de Se. Esse teor é inferior ao relatado por Lyons et al. (2005), que foi de $8,32 \text{ mg kg}^{-1}$ utilizando solo com textura argilosa e concentração de 120 g ha^{-1} de Se, todavia é superior ao observado por Galinha et al. (2015), que foi de $1,06 \text{ mg kg}^{-1}$, em ambos os casos, após o tratamento das plantas com 100 g ha^{-1} de Se.

Os teores de Se nos grãos do *Triticum aestivum* L, variedade BRS 264 confirmam a sua eficiência como variedade indicada para a técnica de biofortificação. Por outro lado, o tratamento do arroz com 2.000 g ha^{-1} de Se resultou em teores de $0,4$ e $0,9 \text{ mg kg}^{-1}$ de Se na parte aérea, quando cultivado em solo argiloso e arenoso, respectivamente (FERNANDES; BERTON; COSCIONE, 2014), teores esses muito inferiores aos relatados em trigo. A maior eficiência do trigo em concentrar Se, comparado ao arroz, pode estar relacionada à maior eficiência na absorção e translocação do trigo (AHMED et al., 2015; DHILLON; DHILLON 2000). As plantas de trigo absorvem aproximadamente 12% do Se disponível na solução do solo arenoso, durante todo o período de crescimento, além disso, mais de 50% do Se acumula nos grãos (KESKINEN; TURAKAINEN; HARTIKAINEN, 2010).

As doses crescentes de Se impostas pelos tratamentos refletiram em aumento nos teores de Se nas folhas e nos grãos. No entanto, somente foi observada uma relação proporcional, entre os teores de Se dos tratamentos com os teores de Se nos grãos. A proporcionalidade permitiu a elaboração de uma reta, onde no eixo 'y' foram plotados as concentrações de Se, enquanto no eixo 'x' foram plotados os teores de Se observados dos grãos (**Fig. 2**).

Figura 2 - Relação da aplicação via solo de concentrações crescentes de Se com os teores de Se nos grãos de trigo.

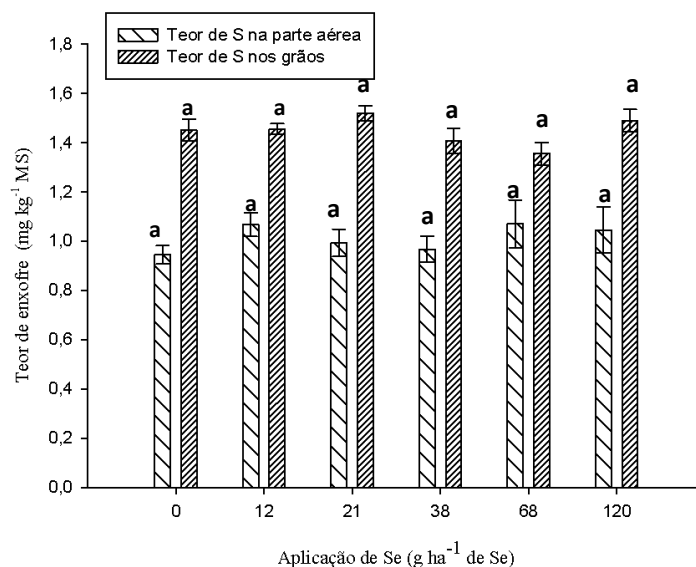


Esta curva pode ser útil para se estimar o teor de Se no grão antes do plantio, programando melhor as doses com Se. No entanto, é necessário considerar o tipo de solo, a idade da planta, a forma da adubação e a fonte utilizada de Se. Com base na equação da reta, $y=53,482x-1,49$ (**Fig. 2**) e utilizando os dados de Lyons et al. (2004) que, observaram $2,13 \text{ mg kg}^{-1}$ de Se nos grãos após o tratamento com 100 g ha^{-1} de Se, assim temos: $100 = 53,482x - 1,49$; $x = 1,84$. Através da equação obtivemos o valor de $1,84 \text{ mg kg}^{-1}$ de Se, valor que representa 86% do valor observado no experimento de Lyons et al. (2004).

As crescentes doses de Se não influenciou os teores de S nas folhas e nos grãos (**Fig. 3**). No entanto, Boldrin et al. (2013) em arroz, Ramos et al. (2011) em alface e Boldrin et al. (2016) em trigo observaram incrementos nos teores de S nas folhas, mas em todos estes trabalhos citados as doses de Se utilizadas foram superiores aos doses do presente estudo. O aumento nos teores de S nas folhas, possivelmente está ligado a uma maior expressão dos genes

relacionados os transportadores de sulfatos, presentes nas raízes (BOLDRIN et al., 2016). Além disso, os teores de S nos grãos são superiores aos observados nas folhas, isto pode implicar em uma demanda maior de S na fase de enchimento dos grãos, via fornecimento externo, visto que o S é um elemento pouco redistribuído. Em virtude disso, possivelmente, se a aplicação do Se em doses adequadas, ocorrer próximo a fase de enchimento dos grãos ou se houver o fornecimento constante deste elemento, os teores de S podem ser incrementados nos grãos.

Figura 3 - Efeito da aplicação via solo de concentrações crescentes de Se, nos teores de enxofre (S) na parte aérea das plantas (A) e nos grãos (B) de trigo.



Legenda: A barra de erro representa o erro padrão das médias (n=4). Letras diferentes acima das colunas indicam diferença significativamente entre os tratamentos ao nível de 5% ($p < 0,05$) de probabilidade pelo teste Skott-Knott.

3.2 Produtividade Agronômica

Os tratamentos com Se não influenciaram o peso total dos grãos, o peso de 1.000 grãos e a umidade dos grãos (**Tabela 4**). Porém, o acúmulo de biomassa da parte aérea das plantas de trigo foi influenciado positivamente pelo Se, independentemente dos tratamentos via solo. As plantas que foram tratadas com 38 g ha⁻¹ de Se apresentaram o maior incremento de biomassa, 53%, enquanto que o tratamento com 120 g ha⁻¹ de Se proporcionou o menor incremento, 23%, em ambos os casos comparando-se com o controle (**Tabela 4**).

Tabela 4 - Efeito da aplicação via solo de concentrações crescentes de Se na produtividade agronômica.

Tratamentos (g ha ⁻¹ de Se)	Produtividade de grãos (g)	Peso de 1.000 grãos (g)	% umidade do grão	Biomassa da parte aérea (g) de 3 plantas
0	420,00 a	32,50 a	9,72 a	1,40 b
12	390,00 a	32,00 a	9,72 a	1,86 a
21	381,25 a	30,75 a	7,75 a	1,94 a
38	390,00 a	31,00 a	8,35 a	2,15 a
68	380,00 a	32,25 a	9,90 a	1,82 a
120	433,75 a	31,75 a	9,22 a	1,74 a

As mesmas letras significam que não houve diferença estatística ($p < 0.05$) de acordo com o teste Scott–Knott's.

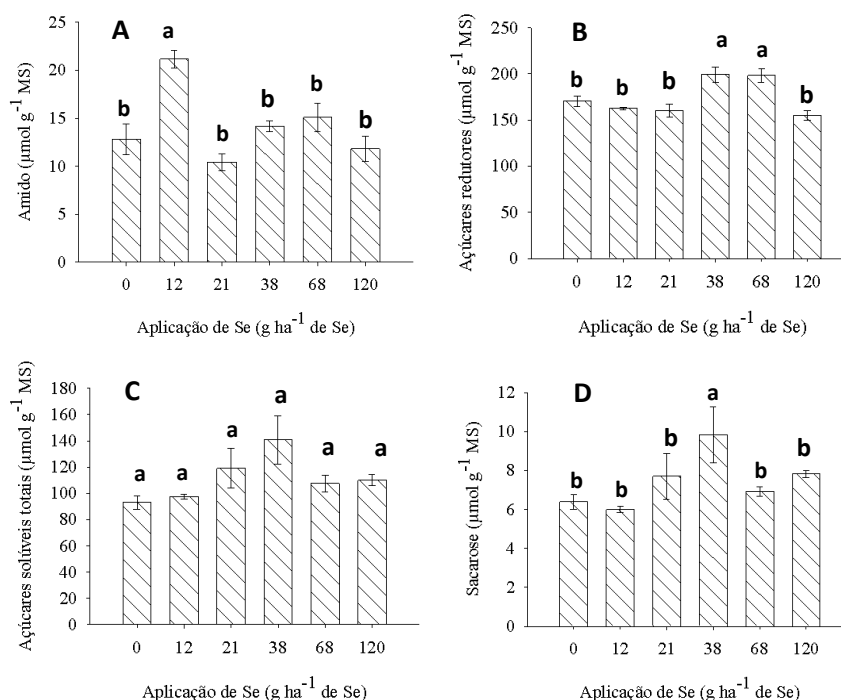
Os tratamentos com Se não aumentaram a produtividade de grãos. No entanto, proporcionaram incrementos na biomassa da parte aérea (PA) em todos os tratamentos. Esses resultados corroboram com aqueles encontrados em trigo (HAJIBOLAND; SADEGHZADE, 2014; GUERRERO et al., 2014) e em arroz (BOLDRIN et al., 2013). No presente trabalho, os incrementos na biomassa podem ser resultado dos efeitos benéficos proveniente do Se, tais como o

aumento nos teores de carboidratos e aminoácidos totais livres, além da maior atividade de algumas enzimas antioxidantes e maior conteúdo de clorofila, esses resultados serão apresentados nos tópicos à frente. O tratamento com 38 g ha⁻¹ de Se promoveu o maior incremento da biomassa da parte aérea, possivelmente em decorrência do maior teor de açúcares solúveis totais (AST) e sacarose (dados demonstrados a frente). Segundo Nayyar e Walia (2003), as moléculas de AST e sacarose são utilizadas como fonte de energia e esqueleto de carbono pelas plantas e, dessa forma, o acúmulo delas pode impulsionar o crescimento.

3.3 Metabolismo dos Carboidratos

Os tratamentos com Se fornecido via solo influenciaram positivamente o acúmulo de carboidratos (**Fig. 4**). O tratamento com 12 g ha⁻¹ de Se proporcionou o maior teor de amido, 21 μmol glicose g⁻¹ na parte aérea, um incremento de 47% em relação ao controle (**Fig. 4A**), enquanto que, o tratamento com 38 g ha⁻¹ de Se promoveu os maiores incrementos nos teores de açúcares redutores (AR) e sacarose, cerca de, 17% e 53%, respectivamente, quando comparados com o controle (**Fig. 4B e D**). Além disso, não foi observada diferença estatística nos teores de açúcares solúveis totais (AST) (**Fig. 4C**) e nas atividades das invertases (**Fig. 5**). Porém, Malik et al. (2011) em feijão tratado com Se observaram aumento atividade da invertase, neste trabalho não foi citado qual a invertase analisada.

Figura 4 - Efeito da aplicação via solo de concentrações crescentes de Se, nos teores de amido (A), açúcares redutores (B), açúcares solúveis totais (C) e sacarose (D) na parte aérea das plantas de trigo.

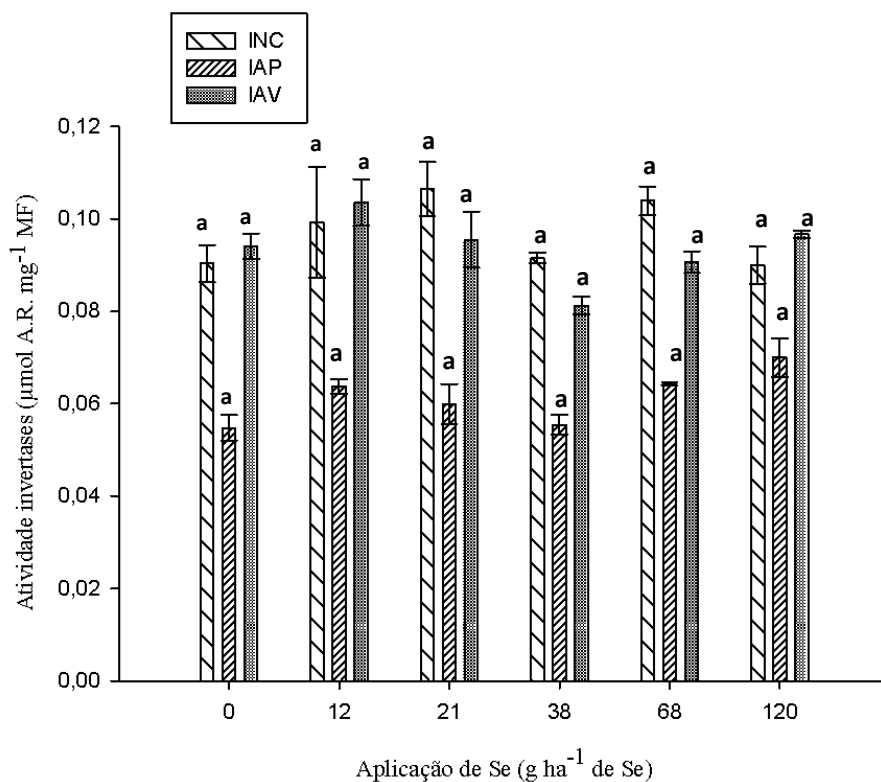


Legenda: A barra de erro representa o erro padrão das médias (n=8). Letras diferentes acima das colunas indicam diferença significativamente entre os tratamentos ao nível de 5% ($p < 0,05$) de probabilidade pelo teste Skott-Knott.

De modo geral, os tratamentos com Se promoveram incrementos nos teores de carboidratos. Em plantas de cevada cultivadas na presença de Se, foi observado um incremento de 46% de AST nas folhas (OWUSU-SEKYERE et al., 2013), valores semelhantes aos 50% que encontramos no tratamento com 38 g ha⁻¹ de Se. O tratamento com 12 g ha⁻¹ de Se promoveu um incremento de 47% no teor de amido com relação ao controle. Em cevada, Owusu-Sekyere et al. (2013) constataram um aumento menor no teor de amido, 34%. Turakainen,

Hartikainen e Seppanen (2004) também relataram aumentos nos teores de AST e amido em plantas de tomate tratadas com Se.

Figura 5 - Efeito da aplicação via solo de concentrações crescentes de Se, nas atividades da invertase neutra do citosol (INC), invertase ácida da parede (IAP) e invertase ácida do vacúolo (IAV) nas folhas de trigo.



Legenda: A barra de erro representa o erro padrão das médias (n=4). Letras diferentes acima das colunas indicam diferença significativamente entre os tratamentos ao nível de 5% ($p < 0,05$) de probabilidade pelo teste Skott-Knott.

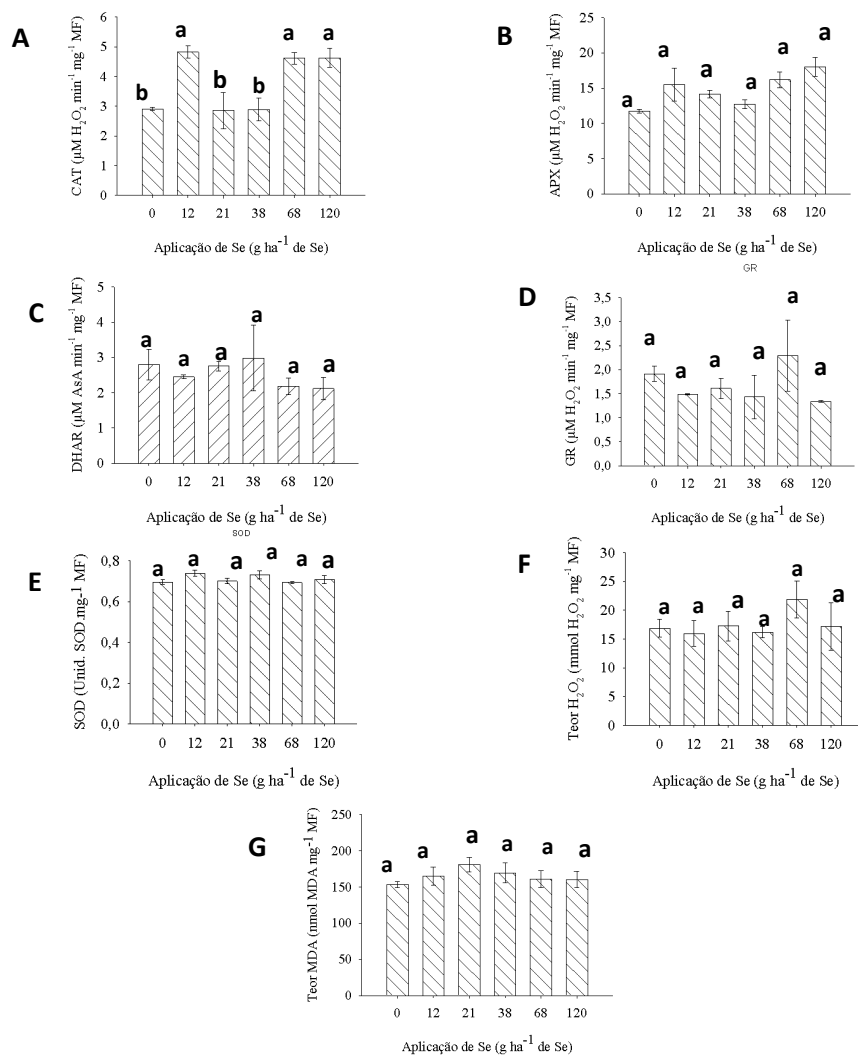
Em suma, a maior concentração de carboidratos proporciona mais substratos e elementos estruturais para o crescimento, culminando em um maior acúmulo de biomassa da parte aérea. Aliado a isso, o acúmulo de carboidratos de cadeias menores pode diminuir a perda de água por transpiração, uma vez que

estas moléculas podem funcionar como agentes osmóticos e sinalizadores (HASEGAWA et al., 2000; ZHU, 2010). Malik et al. (2011) também atribuem o maior crescimento da parte aérea ao maior teor de carboidratos em feijão tratado com Se. Os incrementos observados nos teores de carboidratos, possivelmente, podem ocorrer em virtude de uma maior taxa fotossintética líquida (DIAO et al., 2014), e uma regulação das atividades das enzimas do metabolismo dos carboidratos (MALIK et al., 2011).

3.4 Metabolismo antioxidante

Os tratamentos com 12, 68 e 120 g ha⁻¹ de Se fornecido via solo promoveram incrementos nas atividades das enzimas catalase (CAT) (**Fig. 5A**). O Se, estatisticamente, não promoveu incrementos nas atividades da peroxidase do ascorbato (APX), redutase do dehidroascorbato, redutase da glutaciona e da dismutase do íon superóxido (**Fig. B, C, D e 6E**). Os teores de peróxido de hidrogênio e malonaldeído (MDA) das plantas tratadas com Se permaneceram semelhantes aos teores apresentados pelo controle (**Fig. 5F e G**), apesar disso, os tratamentos com 12, 68 e 120 g ha⁻¹ de Se induziram maiores atividades da CAT. Ramos et al. (2009, 2011), em trabalhos com alface, observaram aumentos significativos na atividade da CAT, quando as plantas foram submetidas à solução nutritiva na presença de Se. A potencialização da atividade de APX e CAT foi observada em *Pteris vittata* cultivada em solução com Se (Feng e Wei, 2012). Além disso, como nesse estudo, Ramos et al. (2010) não observaram incrementos na atividade da SOD. Em muitos casos, as enzimas CAT e APX são as primeiras enzimas a atuarem sob o estresse oxidativo, pois elas atuam dismutando o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio.

Figura 6 - Efeito da aplicação via solo de concentrações crescentes de Se nas atividades enzimáticas da catalase (CAT) (A), peroxidase do ascorbato (APX) (B), redutase do dehidroascorbato (DHAR) (C), redutase da glutatona (GR) (D); dismutase do íon superóxido (SOD) (E), nos teores de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (F) e malonaldeído (MDA) (G) nas folhas de trigo.



Legenda: A barra de erro representa o erro padrão das médias ($n=8$). Letras diferentes acima das colunas indicam diferença significativamente entre os tratamentos ao nível de 5% ($p < 0,05$) de probabilidade pelo teste Skott-Knott.

O A CAT atua em concentrações altas de peróxido de hidrogênio, enquanto a APX atua em concentrações baixas (YOU et al., 2015). A maior atividade destas enzimas possibilita que as plantas aumentem sua tolerância ao estresse, proporcionando assim um maior acúmulo de biomassa (DJANAGUIRAMAN et al., 2005).

Outro ponto importante neste trabalho é que houve incrementos na atividade da CAT, porém, os teores de peróxido de hidrogênio permaneceram semelhantes ao do controle. Como descrito anteriormente, a APX e CAT atuam dismutando o H_2O_2 , e, dessa forma, o aumento na concentração de H_2O_2 induz a atividade da APX e CAT (FENG; WEI, 2012). Porém, neste trabalho, foi observado o aumento na atividade da CAT sem que houvesse incremento nos teores de H_2O_2 , ou seja, a maior atividade das enzimas não é em resposta ao aumento de H_2O_2 , e sim em função da presença do Se.

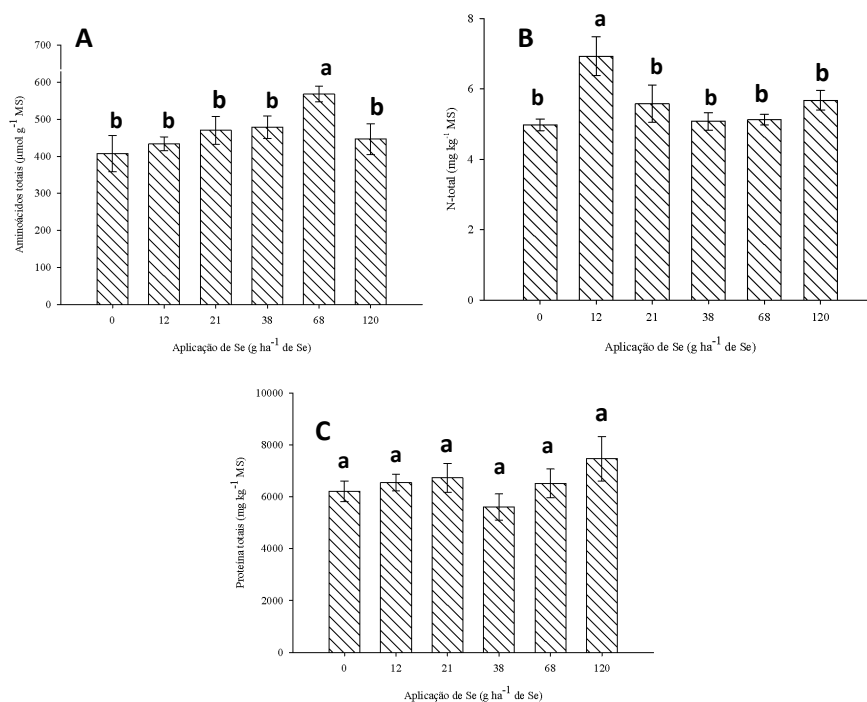
Apesar de aparentemente neste trabalho, o Se não diminuir o teor de MD, em trigo, Iqbal et al. (2015), após a adubação foliar com Se, relataram uma redução significativa nos teores de MDA. No entanto, a diminuição nos teores de MDA em plantas de trigo depende da época de aplicação do Se, uma vez que, os melhores resultados são observados quando as aplicações ocorrem em estágios de desenvolvimento mais avançados das plantas, quando o estresse oxidativo é maior devido uma menor eficiência do fotossistema II podendo gerar superóxido de oxigênio em altas concentrações (CHU et al., 2013). Neste estudo, as coletas foram realizadas em um estágio inicial de desenvolvimento (emborrachamento). O MDA é um produto comum da peroxidação lipídica, sendo utilizado para identificar injúrias causadas pelo estresse oxidativo (WU et al., 2006). A diminuição da peroxidação lipídica pelo Se éser um efeito positivo sob o metabolismo antioxidante das plantas (FENG; WEI; TU, 2013).

3.5 Metabolismo do nitrogênio

O tratamento com 68 g ha^{-1} de Se proporcionou aumento no teor de aminoácidos totais livres, um incremento de 40%, em relação ao controle (**Fig. 6A**), enquanto que o teor de N-total foi 40% maior nas plantas de trigo tratadas via solo com 12 g ha^{-1} de Se (**Fig. 6B**). Neste estudo, com relação às proteínas totais, não foi observada nenhuma influência aparente (**Fig. 6C**),

O aumento na concentração de aminoácidos totais livres não refletiu em um maior teor de proteínas totais. Em trigo, Nawaz et al. (2013) observaram aumento no teor de aminoácidos totais livres, porém, como no presente estudo, os teores de proteínas não foram sensíveis à influência do Se. Rios et al. (2010) relataram que, ambas as formas de selênio - selenato e selenito - , potencializam o metabolismo de nitrogênio, porém o selenito induz mais fortemente o metabolismo, uma vez que induz de uma forma mais acentuada a atividade da redutase do nitrato, redutase da glutatona e a sintase do glutamato. O aumento na atividade, principalmente da RN, pode ser em função da indução na expressão de genes responsivos aos hormônios vegetais, sendo essa indução estimulada pelo Se (TAMAOKI et al., 2008).

Figura 7 - Efeito da aplicação via solo de concentrações crescentes de Se, nos teores aminoácidos totais (A), nitrogênio total (N-total) (B) e proteínas (C) na parte aérea das plantas de trigo.



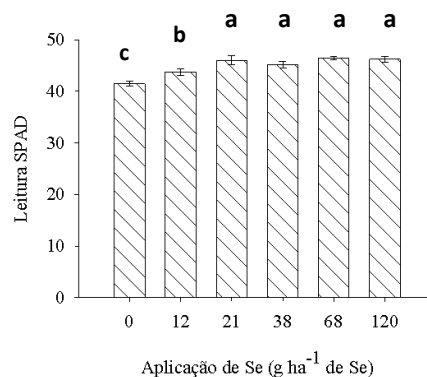
Legenda: A barra de erro representa o erro padrão das médias (para aminoácidos totais e proteínas n=8 e para N-total n=4). Letras diferentes acima das colunas indicam diferença significativamente entre os tratamentos ao nível de 5% ($p < 0,05$) de probabilidade pelo teste Skott-Knott.

3.6 Leitura SPAD

As plantas tratadas com Se apresentaram maiores leituras do SPAD do que as plantas não tratadas (**Fig. 7**), estas leituras são uma forma indireta de quantificar o conteúdo de clorofila presente nas folhas. O tratamento com 12 g ha⁻¹ de Se promoveu um incremento de cerca de 5% nas leituras, enquanto no tratamento com 68 g ha⁻¹ de Se o aumento foi ainda maior, de 12%, em ambos os casos, as comparações foram realizadas com o tratamento controle (**Fig. 7**).

A presença do Se nas plantas de trigo disponibilizado via solo estimulou o incremento no conteúdo de clorofila total neste experimento. Malik et al. (2011) observaram que o incremento no conteúdo de clorofila foi diretamente proporcional às concentrações de Se. O aumento no conteúdo de clorofila total também foi observado por Iqbal et al. (2015) em trigo e por Sharma et al. (2010) em *Brassica napus*, após a adubação com Se. O maior conteúdo de clorofilas totais pode promover um maior fluxo de transporte de elétrons, o que é muito importante no caso do trigo de inverno, uma vez que, em baixas temperaturas o fluxo de transporte de elétrons é afetado negativamente. A diminuição do fluxo de transporte de elétrons pode levar a uma diminuição na taxa fotossintética líquida, devido à limitação na produção de ATP e do poder redutor (FARQUHAR; CAEMMERER; BERRY, 1980).

Figura 8 - Efeito da aplicação via solo de concentrações crescentes de Se nas leituras realizadas com o SPAD.



Legenda: A barra de erro representa o erro padrão das médias (n=5). Letras diferentes acima das colunas indicam diferença significativamente entre os tratamentos ao nível de 5% ($p < 0,05$) de probabilidade pelo teste Skott-Knott.

4 CONCLUSÃO

A biofortificação do trigo com Se, via suprimento radicular (adubação via solo) foi eficiente, pois ocorreu o enriquecimento do grão de trigo com Se. Além disso, o tratamento das plantas de trigo com Se proporcionou efeito benéfico aos metabolismos dos carboidratos, antioxidante e de nitrogênio, uma vez que ocorreram aumentos nos teores de amido, açúcares redutores e sacarose, na atividade da catalase e nos teores de aminoácidos totais e nitrogênio total, além de haver incremento nas leituras como o SPAD.

REFERÊNCIAS

AHMED, M. K. et al. Trace elements in two staple cereals (rice and wheat) and associated health risk implications in Bangladesh. **Environmental Monitoring and Assessment**, Amsterdam, v. 187, n. 6, p. 326-3337, June 2015.

BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 116, n. 2, p. 651-658, Feb. 1998.

BOLDRIN, P. F. et al. Selenium promotes sulfur accumulation and plant growth in wheat (*Triticum aestivum*). **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, May 2016. Epub.

BOLDRIN, P. F. et al. Soil and foliar application of selenium in rice biofortification. **Journal of Food Composition and Analysis**, [New York], v. 31, n. 2, p. 238-244, Sept. 2013.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, May 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Trigo**. [201-]. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/trigo>>. Acesso em: 30 abr. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, New York, v. 52, p. 302-310, Jan. 1978.

CAKMAK, I.; STRBAC, D.; MARSCHNER, H. Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germinating wheat seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 44, n. 1, p. 127-132, 1993.

CHU, J. et al. The effects of selenium on physiological traits, grain selenium content and yield of winter wheat at different development stages. **Biological Trace Element Research**, Clifton, v. 151, n. 3, p. 434-440, Mar. 2013.

CHU, J.; YAO, X.; ZHANG, Z. Responses of wheat seedlings to exogenous selenium supply under cold stress. **Biological Trace Element Research**, Clifton, v. 136, n. 3, p. 355-363, Sept. 2010.

COCKING, E. C., YEMM, E. W. Estimation of amino acids by ninhydrin. **Biochemistry Journal**, [S.l.], v. 58, p. 7-8, Jun. 1954.

DHILLON, K.S.; DHILLON, S. K. Selenium accumulation by sequentially grown wheat and rice as influenced by gypsum application in a seleniferous soil. **Plant and Soil**, The Hague, v. 227, n. 1, p. 243-248, Dec. 2000.

DIAO, M. et al. 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, Sept. 2014.

DISCHE, Z. General color reactions. In: WHISTLER, R. L.; WOLFRAM, M. L. **Carbohydrate chemistry**. New York: Academic, 1962. p. 477-520.

DJANAGUIRAMAN, M. et al. Selenium: an antioxidative protectant in soybean during senescence. **Plant and Soil**, The Hague, v. 272, n. 1, p. 77-86, May 2005.

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

FARQUHAR, G. D.; CAEMMERER, S. von; BERRY, J. A. A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C3 species. **Planta**, [Amsterdam], v. 149, n. 1, p. 78-90, June 1980.

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

FENG, R.W.; WEI, C. Y. Antioxidative mechanisms on selenium accumulation in *Pteris vittata* a potential selenium phytoremediation plant. **Plant, Soil and Environment**, Slezská, v. 58, n.3, p. 105-110, 2012.

FERNANDES, K. F. M.; BERTON, R. S.; COSCIONE, A. R. Selenium biofortification of rice and radish: effect of soil texture and efficiency of two

extractants. **Plant, Soil and Environment**, Slezská, v. 60, n. 3, p. 105-110, Mar. 2014.

GALINHA, C. et al. Characterization of selenium-enriched wheat by agronomic biofortification. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 52, n. 7, p. 4236-4245, July 2015.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I., occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 59, n. 2, p. 309-314, Feb. 1977.

GUERRERO, B. et al. Dual effects of different selenium species on wheat. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 83, p. 300-307, Oct. 2014.

HAJIBOLAND, R.; SADEGHZADE, N. Effect of selenium on CO₂ and NO₃⁻ assimilation under low and adequate nitrogen supply in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Photosynthetica**, Prague, v. 4, n. 4, p. 501-510, Dec. 2014.

HASANUZZAMAN, M.; HOSSAIN, M. A.; FUJITA, M. Selenium-induced up-regulation of the antioxidant defense and methylglyoxal detoxification system reduces salinity-induced damage in rapeseed seedlings. **Biological Trace Element Research**, Clifton, v. 143, n. 3, p. 1704-1721, Dec. 2011.

HASANUZZAMAN, M. et al. Modulation of antioxidant machinery and the methylglyoxal detoxification system in selenium-supplemented brassica napus seedlings confers tolerance to high temperature stress **Biological Trace Element Research**, Clifton, v. 161, n. 3, p. 297-307, Dec. 2014.

HASANUZZAMAN, M.; HOSSAIN, M. A.; FUJITA, M. Selenium in higher plants: physiological role, antioxidant metabolism and abiotic stress tolerance. **Journal of Plant Sciences**, [New York], v. 5, n. 4, p. 354-375, 2010.

HASEGAWA, P. M. et al. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 51, 463-499.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 84, n. 2, p. 450-455, June 1987.

HAWKESFORD, M. J.; ZHAO, FANG-JIE. Strategies for increasing the selenium content of wheat. **Journal of Cereal Science**, London, v. 46, n. 3, p. 282-292, Nov. 2007.

IQBAL, M. et al. U. Exogenously applied selenium reduces oxidative stress and induces heat tolerance in spring wheat. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 94, p. 95-103, Sept. 2015.

KESKINEN, R.; TURAKAINEN, M.; HARTIKAINEN, H. Plant availability of soil selenate additions and selenium distribution within wheat and ryegrass. **Plant and Soil**, The Hague, v. 333, n. 1, p. 301-313, Aug. 2010.

KIPP, A. P. et al. Revised reference values for selenium intake. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, [S.l.], v. 32, p. 195-199, Oct. 2015.

KUMAR, M. et al. Selenium and spermine alleviate cadmium induced toxicity in the red seaweed *Gracilaria dura* by regulating antioxidants and DNA methylation. **Plant Physiology Biochemistry**, New Delhi, v. 51, p. 129-138, Feb. 2012.

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. et al. Selenium concentration in wheat grain: is there sufficient genotypic variation to use in breeding? **Plant and Soil**, The Hague v. 269, n. 1, p. 369-380, Feb. 2005.

LYONS, G. H. et al. High-selenium wheat: agronomic biofortification strategies to improve human nutrition. **Food, Agriculture and Environment**, Helsinki, v. 2, n. 1, p. 171-178, 2004.

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

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e perspectivas**. 2. ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997.

MALIK, J. A. et al. Promotion of Growth in Mungbean (*Phaseolus aureus* Roxb.) by Selenium is Associated with Stimulation of Carbohydrate Metabolism. **Biological Trace Element Research**, Clifton, v. 143, p. 530-539, 2011.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, [S.l.], v. 31, n. 3, p. 426-428, Mar. 1959.

MORA, M. L. et al. Improving selenium status in plant nutrition and quality. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Temuco, v.15, n. 2, p. 486-503, June 2015.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

NAWAZ, F. et al. Selenium (Se) seed priming induced growth and biochemical changes in wheat under water deficit conditions. **Biological Trace Element Research**, Clifton, v. 151, p. 284-293, 2013.

NAWAZ, F. et al. Supplemental selenium improves wheat grain yield and quality through alterations in biochemical processes under normal and water deficit conditions. **Food Chemistry**, London, v. 175, p. 350-357, May 2015.

NAYYAR, H.; WALIA, D. P. Water stress induced proline accumulation in contrasting wheat genotypes as affected by calcium and abscisic acid. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 46, n. 2, p. 275-279, Mar. 2003.

OWUSU-SEKYERE, A. et al. Influence of selenium (Se) on carbohydrate metabolism, nodulation and growth in alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Plant and Soil**, The Hague, v. 373, n.1, p. 541-552, Dec. 2013.

PILON-SMITS, E. A. H.; QUINN, C. F. Selenium Metabolism in Plants. **Cell Biology of Metals and Nutrients**, [New York], v. 17, p. 225-241, 2010.

RAMOS, S. J. et al. Selenium accumulation in lettuce germplasm. **Planta**, [Amsterdam], v. 233, n. 4, p. 649-660, Apr. 2011.

RAMOS, S. J. et al. Selenium biofortification and antioxidant activity in lettuce plants fed with selenate and selenite. **Plant, Soil and Environment**, Slezská, v. 56, n. 12, p. 584-588, Dec. 2009.

RAYMAN, M. P. Selenium and human health. **The Lancet**, London, v. 379, n. 9822, p. 1256-1268, Mar. 2012.

RAYMAN, M. P. The use of high-selenium yeast to raise selenium status: how does it measure up? **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 92, n. 4, p. 557-573, Oct. 2004.

REEVES, M. A.; HOFFMANN, P. R. The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 66, n. 15 p. 2457-2478, Aug. 2009.

RIOS, J. J. et al. Nitrogen-use efficiency in relation to different forms and application rates of Se in lettuce plants. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 29, n. 2, p. 164-170, June 2010.

SHARMA, S. et al. Comparative effects of selenate and selenite on growth and biochemical composition of rapeseed (*Brassica napus* L.). **Plant and Soil**, The Hague, v. 329, n. 1, p. 339-348, Apr. 2010.

TAMAOKI, M. et al. New insights into the roles of ethylene and jasmonic acid in the acquisition of selenium resistance in plants. **Plant Signaling and Behavior**, [S.l.], v. 3, n. 10, p. 865-867, Oct. 2008.

THOMSON, C. D. Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 58, n. 3, p. 391-402, Mar. 2004.

TURAKAINEN, M.; HARTIKAINEN, H.; SEPPANEN, 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**, Washington, v. 52, n. 17, p. 5378-5382, 2004.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, Limerick, v. 151, n. 1, p. 59-66, Fev. 2000.

WU, F.-B. et al. Genotypic Difference in the Responses of Seedling Growth and Cd Toxicity in Rice (*Oryza sativa* L.). **Agricultural Sciences in China**, [Amsterdam], v. 5, n. 1, p. 68-76, Jan. 2006.

YAO, X. et al. Protective role of selenium in wheat seedlings subjected to enhanced UV-B radiation. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v. 58, n. 2, p. 283-289, Mar. 2011.

YOU, J.; CHAN, Z. ROS Regulation during abiotic stress responses in crop plants. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 6, p. 1092-2007, Dec. 2015.

ZENG, Y. et al. Rapid repression of maize invertases by low oxygen: invertase/sucrose synthase balance, sugar signaling potential, and seedling survival. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 121, n. 2, p. 599-608, Oct. 1999.

ZHU, Y. et al. Phylogenetically balanced evidence for structural and carbon isotope responses in plants along elevational gradients. **Physiological Ecology**, [Amsterdam], v. 162, n. 4, p. 853-863, Apr. 2010.