



MARIANE APARECIDA RODRIGUES

**SELÊNIO E SUBSTÂNCIAS HÚMICAS EM PITAIAS
DURANTE O CULTIVO *in vitro* E APÓS ACLIMATIZAÇÃO**

LAVRAS - MG

2020

MARIANE APARECIDA RODRIGUES

SELÊNIO E SUBSTÂNCIAS HÚMICAS EM PITAIAS DURANTE O CULTIVO *in vitro* E APÓS ACLIMATIZAÇÃO

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

Prof^a. Dr^a. Leila Aparecida Salles Pio
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Joyce Dória
Coorientadora

LAVRAS - MG

2020

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

Rodrigues, Mariane Aparecida.

Selênio e substâncias húmicas em pitaias durante o cultivo in vitro e após aclimatização / Mariane Aparecida Rodrigues. - 2020.
79 p. : il.

Orientador(a): Leila Aparecida Salles Pio.

Coorientador(a): Joyce Dória.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Hylocereus. 2. Biofortificação. 3. Substâncias Húmicas. I.
Pio, Leila Aparecida Salles. II. Dória, Joyce. III. Título.

MARIANE APARECIDA RODRIGUES

SELÊNIO E SUBSTÂNCIAS HÚMICAS EM PITAIAS DURANTE O CULTIVO *in vitro* E APÓS ACLIMATIZAÇÃO

SELENIUM AND HUMIC SUBSTANCES IN PITAYAS DURING *in vitro* CULTIVATION AND AFTER ACLIMATIZATION

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

APROVADA em 21 de Fevereiro de 2020

Dr. Guilherme Lopes

UFLA

Dr. Moacir Pasqual

UFLA

Dra. Priscila Pereira Botrel

IF SUL DE MINAS

Dra. Flávia Barbosa Silva Botelho

UFLA

Dra. Leila Aparecida Salles Pio
Orientador

LAVRAS - MG

2020

A Deus, que é a luz que me guia.

*Ao meu pai, Geraldo que nunca desistiu de mim e com seu suor me fez ser o que sou hoje,
obrigada pela minha educação
e à minha mãe Maria do Carmo Campos Rodrigues (in memoriam) pelas cobranças e
ensinamentos.*

Ao meu irmão Cleder, pelos conselhos e por não me deixar desistir.

Ao Bernardo por me mostrar como é bom ser tia.

*A minha madrinha Marlete, por ser a melhor madrinha do mundo, pelo amparo, conselhos e
amor incondicional.*

*Ao meu namorado Kalill pelos bons momentos vividos juntos, muitas vezes me ensinando
desde o primeiro período e sempre incentivando.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela existência.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela oportunidade concedida para a realização do doutorado.

A CAPES, pelo apoio financeiro. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior- Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao programa de pós-graduação em Agronomia/ Fitotecnia por me permitir realizar esse sonho.

A minha orientadora, Dra. Leila Aparecida Salles Pio, pela orientação, confiança, amizade, paciência e por ser tão maravilhosa.

A minha coorientadora, Dra Joyce Dória, pelo apoio e colaboração durante o doutorado.

Aos membros da banca examinadora, Guilherme, Priscila, Moacir e Flávia que gentilmente aceitaram o convite para a avaliação deste trabalho.

Ao professor Júlio Bueno pelo auxílio nas análises estatísticas.

A todos meus familiares, em especial ao Vô João e Tia Darci que me acolheram quando precisei, assim como aos meus sogros Josimar e Auxiliadora.

Aos meus amigos de laboratório Renata, Evaldo, Filipe, Adalvan, Lilian, Vantuil, Sulamara que sempre me ajudaram no que puderam e aos demais colegas do laboratório de cultura de tecidos.

Aos meus amigos da vida Miguel, Flávia, Júnya, Larissa, Fernanda, Cássia e Mayara pela amizade, companheirismo, ensinamentos e momentos de muitas risadas e descontração.

Em especial agradeço ao Josimar e a Martha, que sempre me ajudaram em tudo que podiam e não podiam.

A todos que de alguma forma contribuíram.

RESUMO

Os produtores de frutíferas têm apostado em frutas como a pitaiá, que além de possuir valor econômico atrativo, desperta interesse aos consumidores que buscam por uma alimentação saudável e de qualidade, aliada na prevenção de doenças, com isso ressalta-se a importância do seu cultivo. Nesse contexto, objetivou-se promover um processo de micropropagação e obtenção de mudas de pitaiá de polpa vermelha (*Hylocereus polyrhizus*) sob adição de selênio e substâncias húmicas. Verificou-se o efeito de diferentes fontes de Selênio (selenato e selenito de sódio) e concentrações (0, 12, 24, 36, 48 e 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$) sobre plântulas cultivadas *in vitro* e aclimatizadas, visando avaliar seu acúmulo e as características fisiológicas em pitaiás de polpa vermelha e a viabilidade da biofortificação por cultura de tecidos. O experimento foi disposto em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com cinco repetições por tratamento, contendo seis tubos por repetição. Por outro lado, para o estudo das substâncias húmicas, avaliaram-se ácidos húmicos e ácidos fúlvicos e concentrações (0, 5, 10, 20 e 40 mg L^{-1}) e seus efeitos sobre o crescimento, variáveis fisiológicas e anatômicas em plantas cultivadas *in vitro* e aclimatizadas, tendo em vista melhor desempenho e tolerância em pitaiás vermelhas. Foram utilizadas cinco repetições (10 tubos/repetição) em esquema fatorial. Dessa forma, conclui-se que a concentração 36 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de selenato foi a mais eficiente para a obtenção de plantas com maiores acúmulos de selênio após aclimatizadas, sem acarretar prejuízos em caracteres fitotécnicos, complexos enzimáticos e fotossintetizante e a cultura de tecidos é viável para na biofortificação de pitaiá. Além disso, constatou-se que a concentração 20 mg L^{-1} de ácido fúlvico e promoveu um destaque para suas características de enraizamento e variáveis anatômicas das plantas de pitaiá.

Palavras-chave: *Hylocereus*. Biofortificação. Substâncias Húmicas.

ABSTRACT

Fruit producers have invested on fruits such as pitaya, which besides having an attractive economic value, awakens interest to consumers who seek a healthy and quality diet, combined with the prevention of diseases, thus emphasizing the importance of its cultivation. In this context, the aim of this study was to promote a micropropagation process and obtain seedlings from red fleshed pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) under addition of selenium and humic substances. The effect of different Selenium sources (selenite and sodium selenite) and concentrations (0, 12, 24, 36, 48 e 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$) on seedlings cultivated in vitro and acclimatized was verified, in order to evaluate their accumulation and physiological characteristics in red fleshed pitayas and also the viability of biofortification by tissue culture. A completely randomized design (CRD) was used, with five replications per treatment, containing six tubes per replication. On the other hand, for the study of humic substances, humic and fulvic acids and concentrations (0, 5, 10, 20 e 40 mg L^{-1}) and their effects on growth, physiological and anatomical variables in in vitro and acclimatized cultivated plants were evaluated, aiming better performance and tolerance in red pitayas. Five replications (10 tubes/replications) were used in a factorial design. Therefore, it is concluded that the concentration 36 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of selenate was the most efficient to obtain plants with higher accumulations of selenium after acclimatization, without causing losses in phytochemical characters, enzymatic and photosynthesis complexes and tissue culture is viable for the biofortification of pitaya. In addition, the concentration of 20 mg L^{-1} of fulvic enhanced its rooting characteristics and anatomical variables of pitaya plants.

Keywords: *Hylocereus*. Biofortification. Humic substances.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO GERAL	10
1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	Classificação botânica, composição química e aspectos fisiológicos	12
2.2	Selênio e cultura de tecidos	13
2.2.1	Selênio e sua relação com as plantas e seres humanos	15
2.2.2	Enzimas e pigmentos	18
2.3	Substâncias Húmicas e cultura de tecidos	20
2.3.1	Anatomia vegetal e pigmentos fotossintéticos	22
	REFERÊNCIAS	25
	CAPÍTULO 2 - ACUMULO DE SELÊNIO E SEUS EFEITOS EM PLANTAS DE PITAIA <i>in vitro</i> E APÓS ACLIMATIZAÇÃO	35
1	INTRODUÇÃO	37
2	MATERIAL E MÉTODOS	39
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4	CONCLUSÕES	54
	REFERÊNCIAS	56
	CAPÍTULO 3 - RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E ANATÔMICAS DE PLANTAS DE PITAIA SOB ADIÇÃO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS <i>in vitro</i> E APÓS ACLIMATIZAÇÃO	60
1	INTRODUÇÃO	62
2	MATERIAL E MÉTODOS	63
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4	CONCLUSÕES	76
	REFERÊNCIAS	77

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

A produção mundial de frutas exóticas encontra-se em expansão. Espécies ainda pouco conhecidas de frutíferas têm sido estudadas como alternativa às espécies tradicionais a fim de atender novas demandas e exigências de mercados interno e externo por novos sabores, cores e texturas.

Assim, os produtores têm apostado em frutas como a pitaiá, que além de possuir valor econômico atrativo, desperta interesse aos consumidores que buscam por uma alimentação saudável e de qualidade, aliada na prevenção de doenças.

Essa fruta, conhecida como fruta do dragão, possui uma qualidade nutricional bastante interessante expressando quantidade significativa de compostos fenólicos, proteínas, betalaínas, vitaminas B, C e, bem como minerais, como ferro, cobre e zinco, o que a faz ser chamada de superfruta e ser aliada no combate ao câncer e doenças cardiovasculares.

A propagação dessa planta é via seminífera, mas normalmente é feita vegetativamente por meio de estacas de cladódios que devido a sucessivas podas são abundantes, contudo tem o empecílio de poder disseminar doenças. Contudo, a micropropagação é uma técnica viável para essa espécie, pois as plantas são multiplicadas rapidamente e com boas condições fitossanitárias, gerando benefícios para o produtor.

Na micropropagação usa-se um meio de cultivo que pode ser enriquecido com diversos fitorreguladores e nutrientes. O selênio (Se) é um elemento não essencial, porém benéfico as plantas e pode ser adicionado ao meio de cultivo. Já para a espécie humana é considerado um elemento essencial e tem efeito protetor contra câncer, doenças cardiovasculares e diabetes.

In vitro, o Se adicionado no meio de cultivo pode ser absorvido pela planta e armazenado em sua biomassa. Esse elemento em certas doses pode ser benéfico durante o desenvolvimento das plantas levando assim uma muda de maior qualidade ao campo e com o diferencial da presença do selênio em sua composição. Visto que cladódios de pitaiás também são comestíveis.

Outros componentes que podem ser acrescentados ao meio de cultivo são as substâncias húmicas, as quais impulsionam o crescimento e desenvolvimento de plantas por meio da melhoria da absorção de nutrientes por meio de seu estímulo a promoção

radicular. Por conseguinte, as plantas quando aclimatizadas tem melhor tolerância as adversidades do campo.

Nesse contexto, objetivou-se avaliar o efeito de diferentes fontes de selênio (selenato e selenito de sódio) e suas concentrações, em plantas cultivadas *in vitro* e aclimatizadas, visando seu acúmulo e características fisiológicas em pitaias de polpa vermelha (*Hylocereus polyrizus*). Como também avaliar o efeito de diferentes fontes de substâncias húmicas (ácidos húmicos e ácidos fúlvicos) e suas concentrações sobre o crescimento, variáveis fisiológicas e anatômicas em plantas cultivadas *in vitro* e aclimatizadas, tendo em vista o melhor desempenho em pitaias vermelhas (*Hylocereus polyrizus*).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Classificação botânica, composição química e aspectos fisiológicos

A pitáia é uma planta rústica, originária da América Central e encontrada do Sul do México ao norte da América do Sul (LUDERS e MCMAHON, 2006; MOREIRA et al., 2012). Acredita-se que o Brasil seja um dos centros de origem dessas plantas (JUNQUEIRA et al., 2010) da família Cactaceae.

Várias espécies de pitáia podem ser encontradas no mundo, tornando assim a classificação botânica difícil (LIMA et al., 2013). A pitáia de casca e polpa vermelha (*Hylocereus polyrhizus*), é a que apresenta maior produção e consumo (LE BELLEC et al., 2006). Essa especificamente pertence ao gênero *Hylocereus* Britton & Rose. Os outros gêneros principais das pitaias são: *Stenocereus* Britton & Rose, *Cereus* Mill. e *Selenicereus* (A. Berger) Riccob (LE BELLEC et al., 2006).

O gênero *Hylocereus* está amplamente distribuído em todo o mundo em 16 espécies, difundidas em locais onde as condições ecológicas são limitantes (SOLANO et al., 2005). As mais cultivadas são *H. undatus*, pitáia vermelha e de polpa branca; *H. polyrhizus*, pitáia de casca e polpa vermelha, e *H.* ou *Selenicereus megalanthus*, pitáia amarela de polpa branca (LE BELLEC et al., 2006; ORTIZ-HERNÁNDEZ e CARRILLO-SALAZAR, 2012; CEJUDO-BASTANTE et al., 2016).

Existe uma confusão no reconhecimento das espécies devido a ampla variação morfológica nas estruturas vegetativas, sendo a classificação baseada geralmente no número de aréolas, contorno da haste, no tamanho e cor dos frutos (CÁLIX DE DIOS, 2005) número e tamanho das brácteas, além de teor de sólidos solúveis (CASTILLO-MARTÍNEZ et al., 2005).

Plantas do gênero *Hylocereus* são hemiepífitas (CACIOPPO, 1990), tem sistema radicular superficial, fasciculado com aproximadamente 15 cm de profundidade no solo (LE BELLEC; VAILLANT e IMBERT, 2006), possuem cladódio (caule) suculento (CANTO; 1993) em formato triangular (LICHTENZVEIG et al., 2000) com espinhos de 2 a 4 cm de comprimento (CANTO, 1993). Esses espinhos são formados a partir de estruturas especializadas chamadas aréolas, que também originam hastes (brotos compridos), folhas e flores.

A espécie *H. polyrhizus* apresenta flores brancas com sépalas de ápices avermelhadas, medindo de 25 a 30 cm de comprimento. Os frutos medem de 10 a 12 cm de

diâmetro, pesando até 350 g e possuem coloração de polpa da cor vermelha (LE BELLEC; VAILLANT e INBERT, 2006) com pequenas sementes pretas ovaladas, de 2-3 mm de largura, em grande número e eficientes na germinação (HERNANDEZ, 2000).

Nessa espécie existem as variedades Cebra e Orejana, que se diferem entre si pela coloração da polpa e escamas dos frutos. A Orejana apresenta escamas mais alongadas e sua polpa é mais avermelhada, já a Cebra possui escamas mais curtas e polpa de coloração vermelho forte, mais voltada para roxo (MOREIRA, 2018).

Seu florescimento em Lavras-MG ocorre de novembro a março (dias longos) (MARQUES et al., 2011) e após a antese os frutos demoram cerca de 34 a 43 dias para maturação completa (MARTINS e CAVALLARI, 2011). Esses frutos possuem quantidade significativa de compostos fenólicos, betalaínas (GARCÍA-CRUZ et al., 2013), vitaminas, bem como minerais, como potássio, ferro, cálcio, manganês e zinco (CORDEIRO et al., 2015). No caso da presença de selênio em frutos de *Hylocereus undatus*, Jeronimo, (2016) observou que não havia a presença do oligoelemento em sua composição.

É importante ressaltar que as hastes jovens de *Hylocereus* também são comestíveis (CASTILLO -MARTÍNEZ; LIVERA-MUÑOZ e MÁRQUEZ-GUZMÁN, 2005; JUÁREZ-CRUZ et al., 2012), bem como botões de flores frescas que são preparados na forma de legumes, enquanto os secos são usados para a medicina caseira (ORTIZ-HERNÁNDEZ, 1999), em Taiwan, as flores secas são consumidas como vegetais (MIZRAHI e NERD, 1999). Juárez-Cruz et al. (2012) consideram hastes jovens de alto valor nutricional; P K Ca Mg Na (0,2; 2,3 - 4,8; 0,4 - 0,5; 0,6 - 0,7; 0,07 a 0,1) em % de MS (massa seca): Cu Fe Mn Zn (9 - 16, 7,5 - 28,8, 30,5 - 40, 9,1 - 34) em mg kg⁻¹ de MS.

A planta tem baixa exigência hídrica e alto potencial produtivo, podendo assim ser cultivada em áreas com pequenas pluviosidades ou com períodos de secas sazonais, (ALVARADO; CRUZ e RINDERMANN, 2003). Segundo García-Rubio (2015) o gênero *Hylocereus* requer precipitação média anual de 800 a 1.500 mm e temperatura média (20 a 24 °C). Isso se deve ao fato da pitáia possuir características morfológicas para controlar condições adversas, como o metabolismo ácido crassuláceo (CAM), modificação do caule para o armazenamento de água, a redução ou ausência de folhas e a superfície cerosa. (CEUSTERS et al., 2009).

2.2 Selênio e cultura de tecidos

Os seres humanos necessitam de pelo menos 50 nutrientes dos quais 22 são essenciais para uma vida saudável, (WELCH e GRAHAM, 2004; WHITE e BROADLEY, 2005; GRAHAM et al., 2007) nutrientes esses que são obtidos muitas vezes a partir de plantas que os absorvem e acumulam nos seus tecidos (DE ALMEIDA; DUTRA e FILHO, 2016).

Muitas pessoas ainda não têm acesso a todos esses nutrientes e deficiências nutricionais atingem grande parte da população mundial. Estima-se que 15% da população mundial é deficiente em Se (WHITE e BROADLEY, 2005), ou seja, aproximadamente um bilhão de pessoas (COMBS, 2001). É estimado que a deficiência de micronutrientes no geral, atinge três bilhões de pessoas em todo o mundo, principalmente nos países em desenvolvimento (ANDRÉ et al., 2018) e a causa disso está relacionada a solos com baixa fitodisponibilidade de micronutrientes e a um consumo de alimentos com baixo conteúdo nutricional, relacionado a ausência de produtos de origem animal na dieta (WELCH; GRAHAM, 2002, WELCH e GRAHAM 2005; WHITE e BROADLEY, 2005; GRAHAM et al., 2007).

A disponibilidade de Se nos solos advém de vários fatores, sendo a interação entre as espécies Se e os componentes sólidos do solo um princípio importante a ser considerado. Assim, fala-se que os solos tropicais possuem altas quantidades de óxidos de ferro (Fe) e alumínio (Al), ambos com alta capacidade de reter ânions como selenato, diminuindo assim a disponibilidade de Se na solução desses solos (ARAUJO et al., 2018; LESSA et al., 2016).

No Brasil segundo Lopes; Ávila e Guilherme (2017) e dos Reis et al. (2017) as culturas agrícolas acumulam baixas quantidades de Se devido ao sua pequena quantidade nos solos e como forma de combater as deficiências nutricionais em humanos, a biofortificação de plantas surgiu como uma alternativa de enriquecimento nutricional dos alimentos durante a produção no campo pela adição de nutrientes, podendo ser executada de duas formas: pelo melhoramento genético – biofortificação genética (convencional ou transgenia) ou pelo manejo da cultura – biofortificação agrônômica (VERGÜTZ et al., 2016). A biofortificação agrônômica é efetuada por meio de algumas técnicas, tais como: adubação via solo, tratamento de sementes, aplicação foliar e hidroponia (LOUREIRO et al., 2018).

As fonte de Se, selenato e selenito, são as formas mais utilizadas em práticas de biofortificação na agricultura (PENG et al., 2016).

Além das técnicas de cultivos convencionais no solo, a micropropagação se destaca como uma forma alternativa de cultivo, em que as plantas são submetidas a condições específicas, como adições de componentes no meio de cultura e assim gerando a possibilidade de se incluir elementos como o Se com intuito de obtenção dos benefícios que ele pode fornecer. Em teoria, os vegetais cultivados em meio de cultura são capazes de absorver Se e armazená-lo em sua biomassa e redistribuí-lo para os frutos ao longo do seu ciclo de vida.

Nenhum trabalho até o momento quantificou-se o Se absorvido e acumulado nas plantas *in vitro*, bem como a sua extrapolação para casa de vegetação como proposto no presente trabalho.

Há registros sobre indução de variação somaclonal induzida por micropropagação tendo em vista aumentar betacaroteno para agregar teores de vitamina A em batata doce (AKOMEAH et al., 2019) e uso de protoplastos em petúnia (POTRYKUS, 2015).

Há também artigos sobre o impacto do Se no crescimento de plantas medicinais e produção de metabolitos, enzimas e proteínas *in vitro*, (KAPOOR et al., 2012) sobre propriedades fisiológicas (DOMOKOS-SZABOLCSY et al., 2018) e até mesmo a respeito do aparato fotossintético e sua potencial ação atenuante frente ao excesso e escassez de outros micronutrientes *in vitro* (SOUZA, 2018).

Deve-se ressaltar que como o selênio estimula o crescimento das plantas e auxilia na resistência a estresse hídrico (ANDRADE et al., 2018) e a estresses abióticos no geral (FENG et al., 2013), mudas aclimatizadas advindas de cultura de tecidos terão alta qualidade fitossanitária aliada a resistência.

2.2.1 Selênio e sua relação com as plantas e seres humanos

O selênio é um elemento de número atômico 34 e massa atômica $78,96 \text{ g mol}^{-1}$, representado pelo símbolo Se. Na tabela periódica é encontrado entre o enxofre (S) e o telúrio (Te), considerado um metaloide com propriedades químicas e físicas muito semelhantes as do enxofre (TINGGI, 2003). Estima-se que ele seja o 69º elemento mais abundante na crosta terrestre (ATSDR, 2003).

O selênio presente no solo origina-se a partir de diferentes fontes, sendo elas: fonte litogênica, pedogenética, fitogênica, atmosférica e antropogênica. E ocorre naturalmente sob quatro estados: elementar (Se^0), seleneto (Se^{2-}), selenito (SeO_3^{2-}) e selenato (SeO_4^{2-}), e ainda em formas orgânicas (compostos metilados, selenoaminoácidos, selenoproteínas e

seus derivados) ou como dióxido de Se nas cinzas provenientes da calcinação de minérios sulfetados (FISHBEIN, 1991; KABATA-PENDIAS e MUKHERJEE, 2007). O comportamento e a geodisponibilidade do Se em solos são bastante instáveis e complexos (DE ALMEIDA; DUTRA e FILHO 2016). Segundo esses autores, o selenito e o selenato são as formas inorgânicas de Se predominantes em grande parte das condições redox naturais do solo, sendo que o selenito apresenta o maior potencial tóxico. As plantas podem absorver o Se como selenato, selenito ou como complexos orgânicos de Se (LI et al., 2008).

O teor médio de Se nos solos do planeta é estimado de 0,2 a 0,33 mg dm⁻³, (USGS, 2004) sendo os teores mais altos observados em solos argilosos e orgânicos (KABATA-PENDIAS e MUKHERJEE, 2007).

Em se tratando do conteúdo de Se em solos brasileiros, baseando nos teores oriundos de 7 Estados, a mediana é de 70 µg kg (DOS REIS et al., 2017), que é um valor considerado baixo, que gera assim alimentos com níveis muito baixos de Se produzidos nesses solos. Outro estudo determinou teores de Se em solos do cerrado brasileiro variando de 22 a 72 µg kg (CARVALHO et al., 2019). Nesse contexto, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento permite desde o ano de 2016 a adição de Se nos fertilizantes utilizados no Brasil pela normativa N° 46/2016 (BRASIL, 2016).

É importante ressaltar que as culturas agrícolas são sensíveis às altas concentrações de Se nos tecidos, e essa sensibilidade varia entre as espécies (RANI et al., 2005; LYONS et al., 2005). Em baixas concentrações na planta, o Se atua como antioxidante, o que permite aumentar produção de biomassa vegetal (RAMOS et al., 2010), sendo assim benéfico para o crescimento das mesmas, enquanto que, em altas concentrações nos tecidos o Se promove a fitotoxicidade. Dessa forma, enfatiza-se a estreita relação que existe entre os teores benéfico e tóxico do Se para as plantas (cerca de 10 vezes) (DE ALMEIDA; DUTRA e FILHO, 2016). Ainda, o consumo de alimentos vegetais com teores elevados de Se podem ser prejudiciais a saúde humana e animal.

As plantas podem ser classificadas como não acumuladoras (25 mg kg⁻¹MS a maioria das plantas), acumuladoras (> 2.000 mg kg⁻¹ MS) e acumuladoras secundárias de Se (1.000 mg kg⁻¹ MS) (TERRY et al., 2000; DHILLON e DHILLON, 2003; WHITE et al., 2004), pois fatores fisiológicos e genéticos interferem na capacidade da planta de absorver e acumular Se em partes comestíveis (WHITE, 2016).

Apesar do Se não ser essencial para as plantas (FENG et al., 2013), esse elemento é considerado muito benéfico. É relatado por Ramos et al. (2011) que o Se pode ajudar as

plantas a se manterem por mais tempo fisiologicamente ativas, aumentando a sua produção vegetal. Esse elemento-traço também pode estimular o crescimento das plantas, conferir tolerância contra fatores ambientais que induzem o estresse oxidativo, como resistência a estresse hídrico (ANDRADE et al., 2018) e fornecer resistência aos agentes patogênicos e à herbivoria, ou seja confere tolerância a estresses abióticos (FENG et al., 2013).

E quando se fala da mobilidade no interior da planta do Se o selenato e o selenito se diferem. O selenato é levado ao xilema e transportado para as raízes, onde será em compostos orgânicos e redistribuídos dentro da planta de maneira semelhante ao enxofre. Já o selenito é convertido em selênio orgânico e se concentra nas raízes (TERRY et al., 2000; SORS et al., 2005; BROADLEY et al., 2007; WHITE et al., 2007).

No caso dos seres humanos o alimento apresenta a principal fonte de ingestão de Se. A maioria das culturas agrícolas fornece o Se na forma do aminoácido seleno-metionina. Outras poucas plantas como as brássicas, cebola e alho, apresentam o Se na forma dos aminoácidos *Se*-metil-seleno-cisteína e γ -glutamil-*Se*-metil-seleno-cisteína. Ou ainda pode ser encontrado na forma inorgânica selenato em plantas e peixes, e, ocasionalmente, também na água (FINLEY, 2006; RAYMAN, 2002).

Quanto a estimativas de exigência desse nutriente as normativas da Organização Mundial de Saúde e da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura recomendam 40 a 50 $\mu\text{g dia}^{-1}$ para mulheres e homens, respectivamente (BECKER et al., 2005). No entanto segundo Kipp et al. 2015 a ingestão de Se recomendada para humanos adultos é de 70 $\mu\text{g pessoa}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, sendo que a quantidade máxima de Se ingerida diariamente não deve exceder 400 μg (BOYD, 2011).

Além de ser essencial nutricionalmente ao ser humano e animais (FAIRWEATHER-TAIT et al., 2011), o consumo de Se está relacionado com a redução da incidência de câncer de próstata, cólon e pulmão (DE ALMEIDA; DUTRA e FILHO 2016). No entanto na maioria dos países, a dieta alimentar não é capaz de fornecer a dose diária recomendada de Se (SAHA; FAYIGA e SONON et al., 2017).

Em humanos, existem duas doenças diretamente associadas à deficiência de Se. Uma delas é a doença de Keshan, que é uma cardiomiopatia endêmica, (COMBS, 2001; FAO, 2001) e a outra doença é conhecida como Kashin-Beck, que é uma osteoartropatia e afeta crianças, ocasionando atrofia, degeneração e necrose do tecido cartilaginoso, e deterioração da articulação (WHO, 1987; RAYMAN, 2002), comumente observadas em algumas regiões da China.

Por outro lado, a ingestão de elevadas quantidades de Se por humanos causa danos aos rins e ao fígado, coagulação sanguínea, necrose do coração e fígado, lesões na pele, perda de cabelo e unha, descoloração e perda dos dentes, cáries, náusea, vômito e odor de alho na boca (WHO, 1987).

2.2.2 Enzimas e pigmentos

O estresse oxidativo é consequência da oscilação da quantidade de espécies reativas de oxigênio (ERO) ou radicais livres. Para reverter o quadro de estresse oxidativo, é necessário diminuir a produção de ERO ou aumentar a quantidade de antioxidantes disponíveis que são representados por enzimas protetoras altamente especializadas que são secretadas no espaço extracelular (ANDRADE, 2010).

O Se possui um efeito benéfico sobre o crescimento e a tolerância do estresse oxidativo em plantas, possivelmente devido a sua relação com a elevação da capacidade antioxidante em aumentar a atividade da catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) (XUE et al., 2001; DJANAGUIRAMAN et al., 2005), enzimas do complexo antioxidante, ou seja, tem papel como cofator em selenoenzimas (EL-RAMADY et al., 2016) e é constituinte de enzimas como GPX (glutathiona peroxidase), tioredoxina redutase (TR) e SOD (BABALAR et al., 2019).

As enzimas APX e CAT atuam diretamente sobre o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (SHARMA et al., 2012). O Se aumenta o conteúdo de peróxido na planta e assim, normalmente também haverá um aumento dessa atividade enzimática (FENG et al., 2013).

Portanto a ingestão de Se promove a síntese de compostos antioxidantes, induzindo alterações no equilíbrio redox celular. O consumo de alimentos com elevadas concentrações de antioxidantes contribui para a proteção das células, prevenindo algumas doenças degenerativas (LEIJA-MARTINEZ et al., 2018), pois assim as funções celulares se mantem em homeostase, que é de fundamental importância para a preservação das células e permeabilidade da membrana (AHMAD et al., 2016).

O aumento da atividade enzimática ocorreu em azevém (HARTIKAINEN et al., 2000), soja (DJANAGUIRAMAN et al., 2005) e alface (RAMOS et al., 2011). Em trigo em maiores concentrações o Se atuou como pró-oxidante. Quando considerada a eficiência de fontes de Se. Cartes et al. (2005) observaram que o selenito foi mais eficiente estimulando a atividade enzimática.

Em maçãs biofortificadas com Se por pulverização foliar as atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) foram marcadamente amplificadas em comparação ao controle, resultando em diminuição de superóxido e peróxido de hidrogênio. Também observaram efeito sobre a integridade da membrana por meio de menor vazamento de íons, nas propriedades nutracêuticas dos frutos retardando a polpa, na redução da firmeza e adiamento do amadurecimento das frutas resultante, na menor taxa de biossíntese de etileno, afetando positivamente qualidade e armazenabilidade de frutos de maçã, além do aumento do teor de Se (BABALAR et al., 2019).

Quando consideram-se os pigmentos fotossintéticos pode se destacar que a eficiência fotossintética, o crescimento e a adaptabilidade das plantas estão particularmente relacionados a um pigmento conhecido como clorofila. Segundo Taiz e Zeiger, (2017) outra classe importante são os carotenoides, pigmentos acessórios relacionados à multiplicação celular, crescimento das plantas e com uma ação fotoprotetora que podem minimizar danos oxidativos nas plantas, por meio da proteção de radicais livres e manutenção da integridade da membrana (PENG e ZHOU, 2009).

Por outro lado, modificações no aparelho fotossintético, podem determinar a plasticidade adaptativa das espécies a essas condições (PACHECO et al., 2013).

Segundo Padmaja et al. (1989) e Hawrylak e Szymańska (2004), o Se altera a biossíntese de clorofilas podendo causar pequeno incremento na concentração desses pigmentos (HARTIKAINEN et al., 2000; EKELUND e DANILOV, 2001; VALKAMA et al., 2003; SEPPANEN et al., 2003; KUZNETSOV et al., 2003).

Djanaguiramanetal et al. (2005) observaram que baixas concentrações de Se aumenta o conteúdo de pigmentos em plantas como clorofilas e carotenoides e é comentado que normalmente a diminuição dos pigmentos fotossintéticos, ou seja, o inverso, é um bioindicador primário de fitotoxicidade de elementos-traço (HAWRYLAK-NOWAK; MATRASZEK e POGORZELEC, 2015).

O acréscimo de clorofila e fotossíntese também causa acréscimo no conteúdo de carboidratos em plantas tratadas com Se (SHAHZADI et al., 2017), podendo levar a um maior crescimento das plantas, acúmulo de biomassa e produtividade, gerando assim uma maior disponibilidade de substratos para energia e formação de compostos orgânicos (MALIK et al., 2010; NAWAZ et al., 2014).

2.3 Substâncias Húmicas e cultura de tecidos

Pesquisas têm buscado novas linhas de ação, uma delas está relacionada as chamadas “intensificações ecológicas” (CANELLAS et al., 2015) que objetivam construir sistemas de produção de alimentos com base em estratégias alternativas de intensificação, com eficiência no uso de nutrientes, redução da necessidade de controle de doenças e pragas e conservação do uso da água (TITTONELL, 2014), mantendo altos níveis de produtividade (TILMAN et al., 2011). Há também uma vertente relacionada a nova geração de culturas adaptadas a sistemas de insumos agroquímicos reduzidos, diminuindo custos e a degradação ambiental visando uma produção sustentável (BROWN et al., 2013), além de que nos últimos anos a Comissão Europeia decretou restrições ao uso de produtos químicos, como as auxinas, na produção vegetal (WISZNIEWSKA et al., 2016).

Nesse âmbito, segundo Canellas et al. (2015), o uso de substâncias húmicas (SH) pode fornecer tecnologia potencial em relação a todos esses aspectos, isso tudo devido a sua bioatividade. Essas substâncias podem aumentar a eficiência do uso de nutrientes, substituir os reguladores sintéticos nas plantas, melhorar a qualidade dos frutos, diminuir a incidência de doenças, melhorar o crescimento e a floração precoces, ajudar a reduzir as taxas de aplicação de fertilizantes. Pode ainda estimular o crescimento radicular devido a ação do tipo hormonal natural capaz de induzir a proliferação das raízes secundárias (CANELLAS et al., 2002).

As SH caracterizam o maior conjunto de carbono orgânico na superfície da terra e são geradas por modificações químicas e biológicas da matéria vegetal e animal por meio do metabolismo microbiano (CANELLAS et al., 2015) no processo de decomposição da matéria orgânica do solo, representando 85 a 90% da reserva total de carbono orgânico no solo (ROSA et al., 2017).

As SH podem ser classificadas com base na sua solubilidade em: ácidos húmicos (AH) solúveis em meio básico e insolúveis em meio fortemente ácido; ácidos fúlvicos (AF) solúveis em meio ácido ou; e as huminas (HU) que não são ativos biológicos e são a fração residual insolúvel em qualquer valor de pH, sendo de mais difícil extração (ODEN, 1919).

Os AH apresentam composição $C_{187}H_{186}O_{89}N_9S$ e os AF apresentam composição $C_{135}H_{182}O_{95}N_5S_2$ (BALDOTTO e BALDOTTO, 2014). Os AF possuem peso molecular inferior, maior polaridade e maior solubilidade (FONTANA et al., 2011), enquanto os AH formam misturas químicas e fisicamente heterogêneas de compostos orgânicos, ligados à

fração mineral dos solos com ausência de repetição na sua organização estrutural (CUNHA et al., 2009).

A respeito das substâncias húmicas, no geral, também são conhecidas por terem efeitos estimuladores sobre o metabolismo secundário com atenuações a estresses como hídrico e salino (OUNI et al., 2014; CANELLAS et al., 2015). Plantas subordinadas ao estresse hídrico demonstraram eficácia no ajuste osmótico, mantendo a absorção de água e o turgor celular em resposta à suplementação com SH (AZEVEDO e LEA, 2011).

As SH ainda podem promover o crescimento das plantas mediante a alterações no metabolismo primário por meio do carbono e do nitrogênio, esse crescimento é definido como bioestimulação, e ocorreu nos trabalhos de Canellas e Olivares (2014) e Rose et al. (2014).

Além disso, também é imputado à essas substâncias aumento no teor de clorofila e no percentual de proteína, taxa de assimilação de CO₂, carboidratos totais, maior atividade da bomba de próton H⁺-ATPase da membrana plasmática, absorção de N, P e K, além de atenuação na condutância estomática e transpiração (MURILLO et al., 2005; TAIZ e ZEIGER, 2017; MAZHAR et al., 2012; CALVO; NELSON; KLOEPPER 2014; HALPERN et al., 2015).

Porém, as respostas das plantas a SH são bastante influenciadas pelas espécies vegetais, modo e taxa de aplicação, fonte da SH, manejo e condições ambientais (TREVISAN et al., 2010), o que tem sido relatado na literatura é que as respostas de monocotiledôneas parecem ser maiores que em dicotiledôneas, embora a base molecular e fisiológica dessa diferença permaneça incerta (CANELLAS et al., 2015).

Com relação as fontes dessas substâncias, as respostas fisiológicas das plantas isoladas de carvão marrom (por exemplo, linhita, leonardita, carvão subbitúrico) são inferiores às observadas em resposta ao incremento isolado de turfa, composto ou vermicompostagem (CANELLAS e OLIVARES, 2014).

Há alguns trabalhos com aplicações de ácidos húmicos e fúlvicos em espécies frutíferas na literatura, como exemplos: limão (SÁNCHEZ-SÁNCHEZ et al., 2002), maçã (NEILSEN et al., 2005), morango (RZEPKA PLEVNES et al., 2011), abacaxi (BALDOTTO et al., 2009), kiwi (MARINO et al., 2008), damasco (FATHY e GABR; SHALL; 2010), uva (FERRARA e BRUNETTI, 2008) e pêssego (MANSOUR et al., 2013), mas nenhum trabalho com pitaiá.

Poucos trabalhos com SH são realizados lançando mão da cultura de tecidos, técnica com alta aplicabilidade na agricultura, que se utiliza de explantes, ou seja, pequenos

fragmentos de tecidos vivos, isolados da planta mãe, desinfestados e cultivados assepticamente, durante períodos indeterminados em meios de cultura propício (ANDRADE, 2002).

São encontrados na literatura trabalhos voltados para o enraizamento por meio de micropropagação (técnica de cultura de tecidos) em frutíferas como ameixa (WISZNIEWSKA et al., 2016), morango (RZEPKA-PLEVNES et al., 2011), como também de uma planta ornamental conhecida como azaleia (ELMONGY et al., 2018).

Quando se fala na influência desses ácidos fúlvicos e húmicos na aclimatização, que é uma fase da micropropagação, Baldotto et al. (2009) comentam que há uma aceleração das taxas de crescimento iniciais do abacaxi micropropagado durante o estágio de aclimatização, principalmente quando as plântulas apresentavam dificuldade no enraizamento.

No caso da pera, o uso de pequenas doses de ácido húmico *in vitro* melhorou o crescimento e a captação mineral de plantas durante a aclimatização, aumentando a altura das plantas, o peso da parte aérea, o teor de clorofila das folhas e melhorou a absorção de nutrientes (MARINO et al., 2009).

2.3.1 Anatomia vegetal e pigmentos fotossintéticos

Pesquisas sobre a estrutura interna dos vegetais podem auxiliar no entendimento de diversos fenômenos ligados ao corpo vegetal e auxiliar em estudos de identificação taxonômica (APPEZZATO-DA-GLÓRIA e CARMELLO-GUERREIRO, 2012).

Mesmo com a expressiva importância ecológica e econômica das cactáceas, são escassas informações sobre temas como anatomia para essa família. Dessa forma, há a dificuldade de compreender o avanço do desenvolvimento e do estabelecimento de mudas em diversos ambientes (ALMEIDA, 2013). Com isso, alterações na anatomia e morfologia estão vinculadas a plasticidade vegetal refletindo-se na taxa de crescimento e de sobrevivência das mesmas (ALVARENGA et al., 2003).

Há relação de alterações anatômicas radiculares com a presença de substâncias húmicas em plantas, no caso de ameixas micropropagadas com doses de SH o estudo anatômico permitiu reconhecer o modo de desdiferenciação que leva à rizogênese adventícia (WISZNIEWSKA et al., 2016). Dessa forma, essas substâncias podem induzir mudanças nas raízes podendo gerar aumento de rizodeposição por exsudação de ânions e enzimas orgânicas, acidificação da rizosfera e associação com micróbios específicos

(BROWN et al., 2013), sendo que as alterações anatômicas decorrentes do aumento da área e do comprimento dos pelos das raízes favorecem a associação de bactérias com a superfície radicular.

Com relação aos pigmentos fotossintéticos, um expressivo grupo são o das clorofilas, que são responsáveis pela conversão da radiação luminosa em energia, sob a forma de ATP e NADPH e nos vegetais superiores são separadas em dois tipos: clorofila *a* e clorofila *b*, constantemente sintetizadas e degradadas de acordo com fatores internos e externos as plantas. Outros pigmentos são os carotenoides que tem função protetora e podem minimizar danos oxidativos em plantas (TAIZ e ZEIGER, 2017).

O pigmento mais representativo nas plantas é a clorofila, que promove a cor verde e é sintetizado nos cloroplastos, enquanto os carotenoides estão entre as cores amarelo, laranja e vermelho (ELIAS et al., 2015).

Ainda há um outro pigmento presente na casca e polpa da pitaita chamado de betalainas, pigmentos esses hidrossolúveis, conhecidos por suas propriedades antioxidante, anti-inflamatória e quimiopreventiva (GARCÍA-CRUZ et al., 2013). Esses pigmentos são divididos em duas classes: betacianina (que gera a cor vermelho-púrpura) e betaxantina (gera a cor amarelo-alaranjado) (NETZEL et al., 2005) e seus teores podem se diferir quanto a forma de cultivo da planta.

As SH podem atuar diretamente no metabolismo vegetal, participando de vários mecanismos como no aumento do teor de clorofilas, no transporte de íons, atividade respiratória, síntese de ácidos nucleicos e a atividade de várias enzimas (BALDOTTO e BALDOTTO, 2014), é importante ressaltar que essa substância também está envolvida na fotossíntese, aminoácidos, carboidratos, conteúdo proteico e síntese de ácidos nucléicos (VAUGHAN e MALCOLM, 1985).

Pesquisas têm mostrado que a aplicação de AH via radicular nas plantas aumenta o crescimento das raízes, acontecendo paralelamente ao aumento da atividade de enzimas que regulam os conteúdos de ERO tanto em raízes como em folhas (GARCIA et al., 2012). Conteúdo esse prejudicial, podendo induzir a inibição enzimática, a degradação de clorofila e causar danos a moléculas orgânicas, incluindo DNA e peroxidação lipídica (APEL e HIRT, 2004).

Benetti et al. (2018) obtiveram resultados positivos em plântulas de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) com relação ao aumento do teor de clorofila nas folhas, assim como Baldotto et al. (2009) após o tratamento de plantas de abacaxi (*Ananas comosus* L.) com AH.

Aumentos nos teores de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, *b* e carotenoides) em plantas de videira também já foram expostos (FERRARA e BRUNETTI, 2008), como também a combinação ácido húmico e fulvico resultou em aumento desses pigmentos, quando aplicados em área preservada (ARAÚJO, 2019).

REFERÊNCIAS

- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. (ATSDR). **Toxicological profile for selenium**. Atlanta, Georgia, 2003. 457 p. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp92.pdf>>. Acesso em: 01 fev. 2016.
- AHMAD, R., et al. Selenium (Se) improves drought tolerance in crop plants – a myth or fact? **Jornal Science Food Agriculture**, v. 96, p. 372-380, 2016.
- AKOMEAH, B. et al. Common garden experiment reveals altered nutritional values and DNA methylation profiles in micropropagated three elite Ghanaian sweet potato genotypes. **PLoS one**, v. 14, n. 4, p. 0208-214, 2019.
- BECKER, W. et al. Nordic Nutrition Recommendations 2004-integrating nutrition and physical activity. **Scandinavian Journal of Nutrition**, v. 48, n. 4, p. 178-187, 2004.
- ALMEIDA, O.J. G. et al. Seedling morphology and development in the epiphytic cactus *Epiphyllum phyllanthus* (L.) Haw. (Cactaceae: Hylocereeae). **The Journal of the Torrey Botanical Society**, v. 140, n. 2, p. 196-214, 2013.
- ALVARADO, M. R. M.; CRUZ, M. A. G.; RINDERMANN, R. S. Pitahaya de México Producción y comercialización en el contexto internacional. In: CALUDIO, F. V. **Pitayas y Pitahayas**, CIESTAAM, Universidad Autónoma Chapingo, p. 98-121, 2003.
- ALVARENGA, A. A. et al. Effects of different light levels on the initial growth and photosynthesis of *Croton urucurana* Baill. in southeastern Brazil. **Revista Árvore**, n. 1, v. 27, p. 53-57, 2003.
- ANDRADE F. R. et al. O selênio protege as plantas de arroz do estresse hídrico. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v:164, p. 562-570, 2018.
- ANDRADE, E. R. et al. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista brasileira de reprodução animal**, v. 34, p. 79-85, 2010.
- ANDRADE, S. R. M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**, Planaltina: Embrapa cerrados, 2002) (Documentos, 58).
- ANDRÉ, H. P. et al. Indicadores de insegurança alimentar e nutricional associados à anemia ferropriva em crianças brasileiras: uma revisão sistemática. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 23, p. 1159-1167, 2018.
- APEL, K., HIRT, H., Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v.55, p. 373-399, 2004.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. (Ed.). **Anatomia vegetal**, Viçosa, MG: UFV, 2012, p. 404.
- ARAUJO A. M. et al., Soil management and ionic strength on selenate retention in oxidic soils. **Ciência e Agrotecnologia**, v.42, n. 4, p. 395-407, 2018.

ARAÚJO, K. V. de. **Qualidade da matéria orgânica e atividade biológica das substâncias húmicas de solos de áreas do bioma Cerrado com diferentes níveis de preservação**. 2019. 63 p. Dissertação (Mestrado em Produção vegetal) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2019.

AZEVEDO, R. A., LEA, P. J. Research on abiotic and biotic stress—what next? **Annals of Applied Biology**, v.159, p. 317-319, 2011.

BABALAR, M. et al. Effect of foliar application with sodium selenate on selenium biofortification and fruit quality maintenance of ‘Starking Delicious’ apple during storage. **Science Food Agriculture**, v. 99, p. 5149–5156, 2019.

BALDOTTO, L. E. B., et al. Desempenho do abacaxizeiro ‘vitória’ em resposta à aplicação de ácidos húmicos durante a aclimação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 979-990, 2009.

BALDOTTO, L.E.B., BALDOTTO, M.A., Adventitious rooting on the Brazilian red-cloak and sanchezia after application of indole-butyric and humic acids. **Horticultura Brasileira**, v. 32, p. 434-439, 2014.

BENETTI, R. et al. Densidade de plantio e substâncias húmicas no cultivo do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.). **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 5, n. 1, p. 75-81, 2018.

BOYD, R. Selenium stories. **Nature Chemistry**, v. 3, p. 570, 06/23/online 2011. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/nchem.1076> >

BRASIL. (2016) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Instrução normativa N° 46 DE 22 de novembro de 2016. Ficam estabelecidas as regras sobre definições, exigências, especificações, garantias, registro de produto, autorizações, embalagem, rotulagem, documentos fiscais, propagandas e tolerâncias dos fertilizantes minerais destinados à agricultura. Available in: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacao/in-46-de-22-11-2016-fert-minerais-dou-7-12-16.pdf/view-7-12-16.pdf>. Accessed 14 Jan 2019.

BROADLEY, M. R. et al. Biofortification of UK food crops with selenium. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 65, n. 2, p. 169-181, 2007.

BROWN, L. K. et al. A conceptual model of root hair ideotypes for future agriculture environments: what combination of traits should be targeted to cope with limited P availability? **Annals of Botany**, v. 112, p. 317-330, 2013.

CACIOPPO, O. Pitaya: una de las mejores frutas producida por Colombia. **Informativo Agro Economico**, p. 15-19, 1990.

CÁLIX DE DIOS, H. “A new subspecies of *Hylocereus undatus* (Cactaceae) from Southeastern México, **Haseltonia**, v. 11, p. 11-17, 2005.

CALVO, P.; NELSON, L.; KLOEPPER, J. W. Agricultural uses of plant biostimulants. **Plant and Soil**, v. 383, p. 3-41, 2014.

CANELLAS, L. P. et al. Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 15-27, 2015.

CANELLAS, L. P., OLIVARES, F. L., Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, p. 1-11, 2014.

CANELLAS, L.P., et al., Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. **Plant Physiology**, v. 130, p. 1951-1957, 2002.

CANTO, A. R. **El cultivo de pitahaya em Yucatan**. Maxcanú: Yucatán, 1993. 53 p.

CARTES, P.; GIANFERA, L.; MORA, M. L. Uptake of selenium and its antioxidative activity in ryegrass when applied as selenate and selenite forms. **Plant and Soil**, v. 276, p. 359-367, 2005.

CARVALHO, G.S, et al. Selênio e mercúrio em solos do cerrado brasileiro e suas relações com as características físicas e químicas do solo. **Chemosphere**, v. 218, p. 412-415, 2019.

CASTILLO-MARTÍNEZ, R.; LIVERA-MUÑOZ, M.; MÁRQUEZ-GUZMÁN, G. J. Caracterización morfológica y compatibilidad sexual de cinco genotipos de pitahaya (*Hylocereus undatus*). **Agrociencia**, v. 39, n. 2, p. 183-194, 2005.

CEJUDO-BASTANTE, M. J. et al. Impact of pH and temperature on the colour and betalain content of Colombian yellow pitaya peel (*Selenicereus megalanthus*). **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 5, p. 2405-2413, 2016.

CEUSTERS, S. A. et al. Differential usage of storage carbohydrates in the CAM bromeliad *Aechmea 'Maya'* during acclimation to drought and recovery from dehydration. **Physiologia Plantarum**, v. 135, n. 2, p. 174-184, 2009.

COMBS, G. F. Selenium in global food systems. **British Journal of Nutrition**, v. 85, n. 5, p. 517-547, 2001.

CORDEIRO, M. H. M. et al. Caracterização física, química e nutricional da pitáia-rosa de polpa vermelha. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 1, p. 20-26, 2015.

CUNHA, T. J. F. et al. Ácidos húmicos em solo fertirrigado no vale do São Francisco. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 1583-1592, 2009.

DE ALMEIDA, H. J.; DUTRA, A. F.; FILHO, A. B. C. Biofortificação de Hortaliças e Saúde Global-Um Enfoque para Selênio, Zinco, Ferro e Iodo. In FILHO A. B. C. **Nutrição e Adubação de Hortaliças**, p.103-150, 2016.

DHILLON, K. S.; DHILLON, S. K. Distribution and management of seleniferous soils. **Advances in Agronomy**, v. 79, n. 1, p. 119-184, 2003.

DJANAGUIRAMAN, M.; et al. Selenium: an-antioxidative protectant in soybean during senescence. **Plant and Soil**, v. 272, n. 1/2, p. 77-86, 2005.

DOMOKOS-SZABOLCSY, E. et al. Selenate tolerance and selenium hyperaccumulation in the monocot giant reed (*Arundo donax*), a biomass crop plant with phytoremediation potential. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 31, p. 31368-31380, 2018.

DOS REIS, A. R. et al. Overview of selenium deficiency and toxicity worldwide: affected areas, selenium-related health issues, and case studies. In: **Selenium in plants**. Springer, Cham, p. 209-230, 2017.

EKELUND, N. G. A.; DANILOV R. A. The influence of selenium on photosynthesis and light-enhanced dark respiration (LEDR) in the flagellate *Euglena gracilis* after exposure to ultraviolet radiation. **Aquatic Sciences**, v. 63, p. 457-465, 2001.

ELIAS, H et al. The effects of plant growth regulators on shoot formation, regeneration and coloured callus production in *Echinocereus cinerascens in vitro*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 120, n. 2, p. 729-739, 2015.

ELMONGY, M. S. et al. The effect of humic acid on endogenous hormone levels and antioxidant enzyme activity during in vitro rooting of evergreen azalea. **Scientia horticulturae**, v. 227, p. 234-243, 2018.

EL-RAMADY, H. et al. Selênio e nano-selênio na nutrição de plantas. **Environmental Chemistry Letters**, v.14, p. 123-147, 2016.

FAIRWEATHER-TAIT S. J. et al. Selenium in human health and disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v:14, p. 1337-1383, 2011.

FATHY, M.A., GABR, M.A., EL SHALL, S.A. Effect of humic acid treatments on 'canino' apricot growth, yield and fruit quality. **New York Science Journal**, v. 3, p. 109-115, 2010.

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

FERRARA, G.; BRUNETTI, G. Influence of foliar applications of humic acids on yield and fruit quality of table grape cv. Italia. **Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin**, v. 42, n. 2, p. 79-87, 2008.

FINLEY, J. W. Bioavailability of selenium from foods. **Nutrition Reviews**, v. 64, n. 3, p. 146-151, 2006.

FISHBEIN, L. II 25 selenium. Metals and their compounds in the environment: occurrence, analysis, and biological relevance. In: **MERIAN, E.** (Ed.). New York: VCH Weiheim, 1991. p. 1153-1190.

- FONTANA, A. et al. Avaliação dos compartimentos da matéria orgânica em área da mata atlântica. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 33, p. 545-550, 2011.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **Human vitamin and mineral requirements**, Rome, 2001.303 p.
- GARCÍA, A. C. et al. Vermicompost humic acids as an ecological pathway to protect rice plant against oxidative stress. **Ecological Engineering**, v. 47, p. 203, 47, 2012.
- GARCÍA-CRUZ, L., et al. Physical, chemical, and antioxidant activity characterization of pitaya (*Stenocereus pruinosus*) fruit. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 68, n. 4, p. 403-410, 2013.
- GARCÍA-RUBIO, L. A. et al. Distribución geográfica de *Hylocereus* (Cactaceae) en México. **Botanical Sciences**, v. 93, n. 4, p. 921-939, 2015.
- GRAHAM, R. D. et al. Nutritious subsistence food systems. **Advances in Agronomy**, v. 92, p. 1-74, 2007.
- HALPERN, M.; et al. The use of biostimulants for enhancing nutrient uptake. **Advances in Agronomy**, v. 130, p. 141-174, 2015.
- HARTIKAINEN, H.; XUE, T. L.; PIIRONEN, V. Selenium as an anti-oxidant and pro-oxidant in ryegrass. **Plant and Soil**, v. 225, p. 193-200, 2000.
- HAWRYLAK, B.; SZYMAŃSKA, M. Selenium as a sulphydrylic group inductor in plants. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 9, p. 329-336, 2004.
- 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**, v. 37, p. 41, 2015.
- HERNANDEZ, Y. D. O. **Hacia el conocimiento y la conservacion de la pitahaya**. Oaxaca: IPN-SIBEJ-CONACYT-FMCN, p. 124, 2000.
- JERONIMO, M. C. **Caracterização química, físico-química, atividade antioxidante e avaliação dos efeitos citotóxicos da pitáia-vermelha [*Hylocereus undatus* (Haw.) Britton & Rose] cultivada no Brasil**. 2016. 56 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da saúde) - Universidade de Brasília, Brasília, 2016.
- JUÁREZ-CRUZ, A. et al. Composición química de tallos inmaduros de *Acanthocereus* spp. e *Hylocereus undatus* (Haw.) Britton & Rose. **Revista Fitotecnia Mexicana**, v 2, 171-175, 2012.
- JUNQUEIRA, K. P. et al. Pitaya accesses genetic variability with different production levels through rapd markers. **Revista Brasileira De Fruticultura**, v. 32, n. 3, p. 840-846, set. 2010.

KABATA-PENDIAS, A.; MUKHERJEE, A. B. **Trace elements form soil to human.** New York: Springer, 2007. 550 p.

KAPOOR, R. et al. Selenium treatment alters phytochemical and biochemical activity of in vitro-grown tissues and organs of *Allium sativum* L. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 48, n. 4, p. 411-416, 2012.

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

KUZNETSOV, V. V.; et al. Selenium regulates the water status of plants exposed to drought. **Doklady Biological Sciences**, v. 390, p. 266-268. 2003.

LE BELLEC, F.; VAILLANT, F.; IMBERT, E. Pitahaya (*Hylocereus* spp.): a new fruit crop, a market with a future. **Fruits**, v. 61, p. 237-250, 2006.

LEIJA-MARTÍNEZ, P. et al. Selenium lettuce biofortification in chitosan and polyacrylic acid complexes. **Agronomy**, v. 8, p. 275, 2018.

LESSA J. H. L., et al., Adsorption-desorption reactions of selenium (VI) in tropical cultivated and uncultivated soils under Cerrado biome. **Chemosphere**, v. 164, p. 271-277, 2016.

LI, Y. et al. Environmental behaviors of selenium in soil of typical selenosis area, China. **Journal of Environmental Sciences**, v. 20, n. 7, p. 859-864, 2008.

LICHTENZVEIG, J. et al. Cytology and mating systems in the climbing cacti *Hylocereus* and *Selenicereus*. **American Journal of Botany**, v. 87, p. 1058-1065, 2000.

LIMA, C. A. de. et al. Características físico-químicas, polifenóis e flavonoides amarelos em frutos de espécies de pitaias comerciais e nativas do Cerrado, **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 2, p. 565-570, 2013.

LOPES A.; ÁVILA F.W.; GUILHERME L. R. G. Selenium behavior in the soil environment and its implication for human health. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 41, p. 605-615, 2017.

LOUREIRO, M. P. et al. Biofortificação de alimentos: problema ou solução?. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 25, n. 2, p. 66-84, 2018.

LUDERS, L. **The ploidia or dragon fruit (*hylocereus undatus*)**. Darwin: University of Darwin, 2004. p. 5.

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

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**, v. 143, n. 1, p. 530-539, 2011.

- MANSOUR, A. E. M. et al. The beneficial of using some biostimulants as a partial replacement of chemical fertilizers in florida prince peach orchards. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 9, p. 867-871, 2013.
- MARINO, G. et al. Mineral content and root respiration of in vitro grown kiwifruit plantlets treated with two humic fractions. **Journal of plant nutrition**, v. 31, n. 6, p. 1074-1090, 2008.
- MARINO, G. et al. *In vitro* treatment with a low molecular weight humic acid can improve growth and mineral uptake of pear plantlets during acclimatization. In: **XI International Symposium on Plant Bioregulators in Fruit Production**, v. 884, p. 565-572, 2009.
- MARQUES, V. B. et al. Fenologia reprodutiva de pitaia vermelha no município de Lavras, MG. **Ciência Rural**, v. 41, p. 984-987, 2011.
- MARTINS, A. B. G. et al. Qualidade de frutos de pitaya em função da época de polinização, da fonte de pólen e da coloração da cobertura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, p. 1162-1168, 2011.
- MAZHAR, A. A. M.; et al. Growth, flowering and chemical constituents of *Chrysanthemum indicum* L. plant in response to different levels of humic acid and salinity. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 8, p. 3697-3706, 2012.
- MIZRAHI Y.; NERD A. Climbing and columnar cacti- new arid lands fruit crops. In: Janick J. ed. Perspective in new crops and new crops uses. **American Society for Horticultural Science**, p. 358-366, 1999.
- MOREIRA, R. A. **Microenxertia de *Selenicereus megalanthus* em diferentes porta-enxertos de pitaia**. 2018. 45 p. Dissertação (Mestrado Programa de Pós Graduação em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, 2018.
- MURILLO, J. M. et al. The response of wild olive to the addition of a fulvic acid-rich amendment to soils polluted by trace elements (SW pain). **Journal of Arid Environments**, v. 63, p. 284–303, 2005.
- NAWAZ, F. et al. Selenium (Se) regulates seedling growth in wheat under drought stress. **Advances in Chemistry**, p. 1-8, 2014.
- NETZEL, M et al. Renal excretion of antioxidative constituents from red beet in humans. **Food Research International**, v.38, p. 1051-1058, 2005.
- NEILSEN, G. H. Postbloom humic-andfulvic-based zinc sprays can improve apple zinc nutrition. **Horticulture Science**, v. 40 n.1, p. 205-208, 2005.
- ODEN, S. The humic acids, studies in their chemistry, physics and soil science. **Kolloidchemie Beih**, v. 11, n. 2, p. 75-260, 1919.
- ORTIZ-HERNÁNDEZ H., Y.D. 1999. Pitahaya: un nuevo cultivo para México. Ed. **Limusa-Grupo Noriega Editores**, Mexico. 111 p.

ORTIZ-HERNÁNDEZ, Y. D.; CARRILLO-SALAZAR, J. A. Pitahaya (*Hylocereus* spp.): A short review. **Comunicata Scientiae**, v. 3, n. 4, p. 220-237, 2012.

OUNI, Y. et al. The role of humic substances in mitigating the harmful effects of soil salinity and improve plant productivity. **International Journal of Plant Production**, v.8, p. 353-374, 2014.

PACHECO, F. V. et al. Gas exchange and production of photosynthetic pigments of *Piper aduncum* L. grown at different irradiances. **American Journal of Plant Sciences**, v.4, p. 114-121, 2013.

PADMAJA, K.; PRASAD, D. K. K.; PRASAD, A. R. K. Effect of selenium on chlorophyll biosynthesis in mung bean seedling. **Phytochemistry**, v. 28, p. 3321-3324, 1989.

PENG, Q. et al. Influence of Pak choi plant cultivation on Se distribution, speciation and bioavailability in soil. **Plant and Soil**, v. 403, n. 1, p. 331-342, 2016.

PENG, Q.; ZHOU, Q. Antioxidant capacity of flavonoid in soybean seedling under the joint actions of rare earth element La(III) and ultraviolet-B stress. **Biological Trace Element Research**, v. 127, p. 69-80, 2009.

POTRYKUS, I. From the concept of totipotency to biofortified cereals. **Annual review of plant biology**, v. 66, p. 1-22, 2015.

RAMOS S. J. et al. Selenium biofortification and antioxidant activity in lettuce plants fed with selenate and selenite. **Plant Soil Environment**, v. 12, 584-88, 2010.

RAMOS, S. J. et al. Selenato e selenito na produção, nutrição mineral e biofortificação com selênio em cultivares de alface. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, p. 1347-1355, 2011.

RANI, N.; DHILLON, K. S.; DHILLON, S. K. Critical levels of selenium in different crops grown in an alkaline silty loam soil treated with selenite-Se. **Plant and Soil**, v. 277, n. 1/2, p. 367-374, 2005.

RAYMAN, M. P. The argument for increasing selenium intake. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 61, n. 2 p. 203-215, 2002.

ROSA, D. M.; et al., Substâncias húmicas do solo cultivado com plantas de cobertura em rotação com milho e soja. **Revista Ciência Agronômica**, v. 48, n. 2, p. 221-230, 2017.

ROSE, M. T., et al. A meta-analysis and review of plant-growth response to humic substances: practical implications for agriculture. **Advances in Agronomy**, v.124, p. 37-89, 2014.

RZEPKA-PLEVNES, D. et al. Effects of auxins and humic acids on in vitro rooting of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 9, p. 592-595, 2011.

SAHA, U.; FAYIGA, A.; SONON, L. Selenium in the soil-plant environment: a review. **International Journal of Applied Agricultural Sciences**, v. 3, n. 1, p. 1, 2017.

SÁNCHEZ-SÁNCHEZ, A. Humic substances and amino acids improve effectiveness of chelate FeEDDHA in lemon trees. **Journal of Plant Nutrition**, v. 25, p. 2433-2442, 2002.

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

SHAHZADI, I., et. al. Foliar application of selenium increases fertility and grain yield in bread wheat under contrasting water availability regimes. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 39, p. 173, 2017.

SHARMA, P., et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, p.1-22, 2012.

SOLANO, J. P. L.; CANO, M. E. A.; HERNÁNDEZ, R. G. Diversidad genética en pitahaya (*Hylocereus undatus* Haworth. Britton y Rose). **Revista Fitotecnia Mexicana**, v. 28, n. 3, p. 179-185, 2005.

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

SOUZA, A. F. C. **Efeito do selênio (se) sobre o aparato fotossintético de *Billbergia Zebrina* (herbert) lindley (*bromeliaceae*) *in vitro* e sua ação atenuante frente ao estresse por zinco (zn)**. 2018. 74 p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo, 2018.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 954 p.

TERRY, N. et al. Selenium in higher plants. **Annual review of plant physiology and plant molecular biology**, v. 51, p. 401-432, 2000.

TILMAN, D., et al. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, U. S. A. v. 108, p. 20260-20264, 2011.

TINGGI, U. Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review. **Toxicology Letters**, v. 137, p. 103-110, 2003.

TITTONELL, P., Ecological intensification of agriculture – sustainable by nature. **Current Opinion in Environmental Sustainability**, v.8, p. 53-61, 2014.

TREVISAN, S. et al. Humic substances induce lateral root formation and expression of the early auxin-responsive IAA19 gene and DR5 synthetic element in *Arabidopsis*. **Plant Biology**, v. 12, p. 604-614, 2010.

UNITED STATES GEOLOGICAL SURVEY. (USGS). **Mineral commodity profiles-selenium**. 2004. 20 p. Disponível em: <<http://pubs.usgs.gov/of/2003/of03-018/of03-018.pdf>>. Acesso em: 26 fev. 2016.

VALKAMA, E.; et al. The combined effects of enhanced UV-B radiation and selenium on growth, chlorophyll fluorescence and ultrastructure in strawberry (*Fragaria ananassa*) and barley (*Hordeum vulgare*) treated in the field. **Agricultural and Forest Meteorology**, v. 120, p. 267–278. 2003.

VAUGHAN, D., MALCOLM, R. E., Influence of humic substances on growth and physiological processes. In: Vaughan, D., Malcolm, R.E. (Eds.), **Soil Organic Matter and Biological Activity**, p. 37–75, 1985.

VERGÜTZ, L, et al. Biofortificação de alimentos: saúde ao alcance de todos. **Boletim Informativo da SBCS**; v. 42, 20-23, 2016.

WELCH, R. M.; GRAHAM, R. D. Agriculture: the real nexus for enhancing bioavailable micronutrients in food crops. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 18, p. 299-307, 2005.

WELCH, R. M.; GRAHAM, R. D. Breeding crops for enhanced micronutrient content. **Plant and Soil**, v. 245, p. 205-214, 2002.

WELCH, R. M.; GRAHAM, R. D. Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 353-364, 2004.

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

WHITE, P. J.; BROADLEY, M. R. Biofortifying crops with essential mineral elements. **Trends in Plant Science**, v. 10, p. 586-593, 2005.

WHITE, P. J. et al. Selenium and its relationship with sulfur. In **Sulfur in plants an ecological perspective Springer**, Dordrecht. p. 225-252, 2007.

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

WISZNIEWSKA A.; et al. Rooting response of *Prunus domestica* L. microshoots in the presence of phytoactive medium supplements. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 125, 163-176, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (WHO). **Environmental health criteria for selenium**. Geneva, 1987. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc58.htm>>. Acesso em: 01fev 2016.

XUE, T.; HARTIKAINEN, H.; PIIRONEN, V. Antioxidative and growth promoting effect of selenium on senescing lettuce. **Plant and Soil**, v. 237, p. 55-61, 2001.

CAPÍTULO 2 - ACUMULO DE SELÊNIO E SEUS EFEITOS EM PLANTAS DE PITAIA *in vitro* E APÓS ACLIMATIZAÇÃO

RESUMO

A pitáia é uma frutífera em expansão de cultivo em diversas partes do mundo e a espécie *Hylocereus polyrhizus* é responsável pela maior produção e consumo. Essa fruta é denominada “superfruta” pela sua riqueza em nutrientes e dela também pode ser consumido cladódios e flores. Assim, torna-se importante propagar essa espécie, sendo a micropropagação de plantas em meio com adição de selênio uma alternativa para promover a biofortificação por um método diferenciado, podendo acelerar o processo de obtenção de mudas com alta qualidade fitossanitária e nutricionalmente superiores, ricas nesse elemento que auxilia no efeito da regulação do sistema imunológico, e na defesa contra infecções virais como o coronavírus. Desta forma, objetivou-se avaliar o efeito de diferentes fontes de selênio (selenato e selenito de sódio) e suas concentrações (0, 12, 24, 36, 48 e 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$), em plantas cultivadas *in vitro* e aclimatizadas, visando seu acúmulo e características fisiológicas em pitaias de polpa vermelha (*Hylocereus polyrhizus*) variedade Cebra, tendo em vista uma nova opção de biofortificação pela cultura de tecidos. O experimento foi disposto em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento, contendo seis tubos por repetição, o meio utilizado foi o MS. Foi obtida a curva de crescimento da espécie por meio de dados obtidos a cada sete dias, durante 49 dias, demonstrando crescimento próximo das fontes de selênio e testemunha. Além disso, avaliaram-se as variáveis fitotécnicas aos 49 dias após cultivo *in vitro* e aos 150 após aclimatização. Também foram avaliados a quantidade de enzimas catalase, superóxido dismutase e ascorbato peroxidase, bem como a quantidade de pigmentos fotossintéticos e o acúmulo de selênio em cada tratamento. A concentração 36 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de selenato mostrou ser a mais eficiente para a obtenção de plantas com maiores acúmulos de selênio após aclimatizadas, sem acarretar prejuízos em caracteres fitotécnicos, complexos enzimáticos e fotossintetizante e a cultura de tecidos é viável para na biofortificação de pitáia.

Palavras-chave: *Hylocereus polyrhizus*. Cultura de tecidos, Enzimas.

ABSTRACT

Pitaya is a fruit in expansion of cultivation in several parts of the world and the species *Hylocereus polyrhizus* is responsible for the highest production and consumption. This fruit is called "superfruit" because of its richness in nutrients and even cladodes and flowers can be consumed. Due to the cultivation potential of this fruit, it is important to propagate this species, and the micropropagation of plants in a medium with the addition of selenium is an alternative to promote biofortification by a different method. This can speed up the process of obtaining seedlings with high phytosanitary and nutritionally superior quality, rich in this element that helps in the effect of the regulation of the immune system, and in the defense against viral infections such as the covid-19. The objective of this work was to evaluate the effect of different sources of selenium (sodium selenate and sodium selenite) and their concentrations (0, 12, 24, 36, 48 and 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$), in plants grown in vitro and acclimatized. Aiming to study the accumulation of selenium and the physiological characteristics in red pulp pitayas (*Hylocereus polyrhizus*) variety Cebra, being a new biofortification option by tissue culture. The experiment was conducted in a completely randomized design, with five replicates per treatment, containing six tubes per repetition, the medium used was the MS. The growth curve of the species was obtained through data obtained every seven days, for 49 days, showing growth close to the sources of selenium and control. In addition, phytotechnical variables were evaluated at 49 days after in vitro cultivation and at 150 days after acclimatization. The amount of catalase, superoxide dismutase and ascorbate peroxidase enzymes were also evaluated, as well as the amount of photosynthetic pigments and the accumulation of selenium in each treatment. The 36 $\mu\text{mol L}^{-1}$ concentration of selenate proved to be the most efficient for obtaining plants with greater accumulations of selenium after acclimatization, without causing damage to phytotechnical characters, enzymatic and photosynthetic complexes, and tissue culture is viable for biofortification of pitaya.

Keywords: *Hylocereus polyrhizus*. Tissue culture. Enzymes.

1 INTRODUÇÃO

A pitaveira é uma frutífera em expansão de cultivo em diversas partes do mundo em razão do seu sabor suave, doce e de seu exotismo, gerando expressiva receptividade nos mercados consumidores como Estados Unidos e Europa, o que tem também estimulado o interesse de muitos produtores (NUNES et al., 2014; LOPES et al., 2016).

Dentre as espécies denominadas pitaias existe uma variação quanto a coloração das polpas e cascas dos frutos. A espécie *Hylocereus polyrhizus* possui casca e polpa vermelha sendo responsável pela maior produção e consumo (LE BELLEC; VAILLANT e IMBERT 2006). A pitavia de polpa vermelha variedade Cebrá possui escamas curtas e polpa de coloração vermelho forte, mais voltada para roxo (MOREIRA, 2018).

Os frutos de pitavia são ricos em compostos fenólicos, betalainas (GARCÍA-CRUZ et al., 2013), vitaminas, bem como minerais: potássio, ferro, cálcio, manganês e zinco, (CORDEIRO et al., 2015). Suas hastes jovens também são comestíveis, (JUÁREZ-CRUZ et al., 2012), e os botões florais são usados em sopas e saladas (TINDADE et al., 2019).

Sua propagação geralmente é realizada vegetativamente por meio de estacas de cladódios, método que apresenta grande risco da disseminação de patógenos, mas que pode ser contornado com o uso da micropropagação: técnica promissora para evitar a produção limitada de alimentos e garantir a segurança alimentar da população (US-CAMAS et al., 2014).

Na micropropagação usa-se um meio de cultivo que pode ser enriquecido com diversos fitorreguladores, (OLIVEIRA; DIAS e BRONDANI, 2013) e nutrientes de acordo com as exigências da espécie (SILVA e FERREIRA, 2016). Um elemento que pode ser adicionado ao meio é o selênio, que será absorvido e fixado na biomassa dessas plantas. Esse elemento estimula o crescimento e auxilia na resistência a estresse hídrico (ANDRADE et al., 2018) e a estresses abióticos no geral (FENG et al., 2013), em concentrações mais baixas, o Se pode melhorar o crescimento das plantas, atuando como elemento benéfico (NATASHA et al., 2018).

O Se não só é benéfico as plantas como também essencial aos seres humanos e é componente de proteínas e aminoácidos importantes para o crescimento e funcionamento de suas células (PUCCINELLI; MALORGIO; PEZZAROSSA, 2017).

Esse elemento auxilia na regulação do sistema imunológico (MAGGINI PIERRE; CALDER, 2018) atuando na defesa antioxidante do hospedeiro e no grau de patogenicidade de vários vírus (GUILLIN et al., 2019) incluindo o SARS coronavírus e o

SARS-COV-2 novo coronavirus (HARTHILL 2011, POLANSKY; LORI 2020) que na atualidade gerou uma pandemia que tem causado milhares de mortes no mundo.

Assim a deficiência de selênio na dieta pode levar a uma maior predisposição a essas infecções (MAGGINI; PIERRE; CALDER, 2018) de modo que um vírus normalmente benigno ou levemente patogênico se torna altamente virulento em hospedeiros deficientes (GUILLIN et al., 2019).

Deste modo um fornecimento nutricional adequado de selênio ajuda a manter a atividade das células NK(linfócitos) e promove a proliferação de células T (leucócitos), que são significativas para essa imunidade antiviral (IVORY et al., 2017) e aumenta a eficácia de vacinas contra muitos patógenos virais (STEINBRENNER et al., 2015), além de que em alguns casos efetivou a prevenção completa das doenças(GUILLIN et al., 2019).

Ressalta-se que no caso da pitaiá até o momento não foi relatada a presença de selênio em sua composição, porém outro elemento que tem tido destaque frente a infecções virais é o Zinco (OSUNA-PADILLA et al., 2020) que é encontrado na concentração de 9,1 a 34 mg Kg⁻¹ de cladódios (JUÁREZ-CRUZ et al., 2012), e em frutos na concentração de 116,26 mg Kg⁻¹ (CORDEIRO et al., 2015), sendo deste modo o suficiente para o consumo diário que tem como recomendação 9,4 mg por dia (RUSSELL et al., 2001). Aliá-los em apenas um alimento é ainda mais interessante para a imunidade humana.

A técnica de micropropagação de plantas em contato com o selênio pode promover portanto a biofortificação, processo que surgiu como uma alternativa de enriquecimento nutricional dos alimentos durante a produção pela adição de nutrientes. Até o momento esse processo poderia ser executado de duas formas: pelo melhoramento genético – biofortificação genética (convencional ou transgenia) ou pelo manejo da cultura – biofortificação agrônômica (VERGÜTZ et al., 2016) por adubação via solo, tratamento de sementes, aplicação foliar e hidroponia (LOUREIRO et al., 2018).

Dessa forma o presente trabalho, utiliza um método diferenciado de enriquecimento de plantas por biofortificação agrônômica, tendo como base a cultura de tecidos vegetais, podendo acelerar o processo de obtenção de plantas nutricionalmente superiores, uma vez que o controle das variáveis ambientais é muito mais eficiente in vitro e além disso tecidos jovens podem ser mais efetivos na absorção e distribuição de minerais. Assim mudas aclimatizadas advindas de cultura de tecidos podem fornecer alta qualidade fitossanitária aliada a resistência a estresses e ainda com conteúdo aumentado de selênio.

Ressalta-se que trabalhos envolvendo biofortificação de plantas geralmente são conduzidos e avaliados até a obtenção do produto final que são usualmente as partes

comestíveis. É necessário observar que os cladódios também são usados na alimentação e estimasse que caso comprovado o acúmulo de Se até a fase de aclimatização, sem comprometer o crescimento vegetal, seja possível produzir mudas com maior conteúdo desse elemento.

Nesse contexto, o presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes fontes de selênio (selenato e selenito de sódio) e suas concentrações, em plantas cultivadas *in vitro* e aclimatizadas, visando seu acúmulo e características fisiológicas em pitaias de polpa vermelha (*Hylocereus polyrizus*) variedade Cebra, tendo em vista uma nova opção de biofortificação pela cultura de tecidos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na cidade de Lavras – MG, Brasil, latitude 21°14' S, longitude 44°59' W, altitude 919 m e clima Cwa, no Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Explantes de 1 cm foram obtidos de plântulas pré-estabelecidas a partir de germinação de sementes *in vitro* de pitaias vermelhas da variedade Cebra e cultivados em meio MS (MURASHIGE E SKOOG 1962) semissólido, acrescido de 25 g L⁻¹ de sacarose, 6 g L⁻¹ de ágar e pH ajustado para 5,7 ± 0,1 antes da autoclavagem. Foram utilizados tubos de ensaio contendo 15 mL de meio de cultura.

Os tratamentos consistiram de duas fontes de selênio (selenato de sódio – Na₂SeO₄ – e selenito de sódio – Na₂SeO₃) nas concentrações 12, 24, 36, 48 e 60 µmol L⁻¹ e uma testemunha, com cinco repetições contendo seis tubos por repetição.

O experimento foi disposto em delineamento inteiramente casualizado. Os tubos foram mantidos em sala de crescimento, com temperatura de 25 ± 1°C durante 49 dias.

Foram avaliados a cada 7 dias durante 49 dias, número de brotos, número de raízes e comprimento do broto, gerando assim um gráfico do comportamento do crescimento das plantas, para poder entender se em algum momento o selênio afetaria as plântulas. Ao final (49 dias de idade), além dessas variáveis que já vinham sendo avaliadas também foram avaliados, comprimento da raiz e matéria fresca e seca total.

Aos 49 dias, 10 plantas de cada tratamento foram aclimatizadas em casa de vegetação acondicionadas em bandejas contendo uma mistura 1:1 de substrato comercial Plantmax® e areia. Após 150 dias foram avaliados: número, comprimento e diâmetro dos brotos e foram transferidas para vasos contendo o mesmo substrato.

Os teores de selênio dos cladódios de plântulas de pitaia foram determinados em plantas com 49 dias de idade cultivadas *in vitro*, em plantas aclimatizadas em casa de vegetação com 150 dias.

As análises de selênio foram realizadas no laboratório de Geoquímica do Departamento de Solos/UFLA. Foram utilizado 100 mg de matéria fresca, formando extratos após digestão ácida, executada por meio de um concentrado de HNO₃ e vasos fechados em forno de microondas de acordo com o método 3051A da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos - USEPA (USEPA, 2007).

O conteúdo de selênio nas soluções digeridas foi medido utilizando espectrômetro de absorção atômica em forno de grafite (Espectrometria de Absorção Atômica com correção de fundo de Zeeman e lâmpada de EDL para Se; AAnalyst™ 800 AAS, Perkin Elmer). A curva de calibração para a medição de Se foi obtida a partir de uma solução padrão com 1 g kg⁻¹ de Se ($\geq 98\%$ de pureza, Fluka, Buchs, Suíça).

Para garantia de qualidade e controle na medição de Se, um material de referência padrão do Instituto de Materiais de Referência e Medidas (White Clover - BCR 402, IRMM, Geel, Bélgica) e uma amostra em branco foram incluídos em cada lote de digestão. O valor médio de recuperação obtido para o material padrão foi de $96,78 \pm 1,88\%$ ($n = 13$).

Para a análise de enzimas do sistema antioxidante os cladódios foram coletados de plantas na cultura de tecidos aos 49 dias e de plantas aos 150 dias em casa de vegetação e imediatamente colocados em nitrogênio líquido e mantidos congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a análise das atividades das enzimas antioxidantes.

0,2 g de tecido foliar fresco foram homogeneizados em 1,5 mL de tampão de extração (fosfato de potássio 0,1 mol L⁻¹, pH 7,8, EDTA 0,1 mmol L⁻¹, pH 7,0, ácido ascórbico 0,01 mol L⁻¹ e 22 mg de polivinilpolipirrolidona - PVPP) em almofariz e pilão pré-refrigerados com nitrogênio líquido, segundo Biemelt; Keetman e Albrecht (1998). Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 13.000 g por 10 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o sobrenadante coletado para análise da atividade enzimática, avaliando-se as seguintes atividades enzimáticas: superóxido dismutase (SOD) (GIANNOPOLITIS e RIES, 1977), catalase (CAT) (HAVIR e MCHALE, 1987) e ascorbato peroxidase (APX) (NAKANO e ASADA, 1981). Foram utilizados 3 repetições em triplicatas para cada tratamento.

Os pigmentos fotossintéticos analisados foram clorofila *a*, clorofila *b*, total e carotenoides. A extração foi realizada conforme metodologia descrita por Lichtenthaler e Buschmann (2001). As análises foram realizadas no Laboratório de Cultura de Tecidos (Departamento de Agricultura/UFLA).

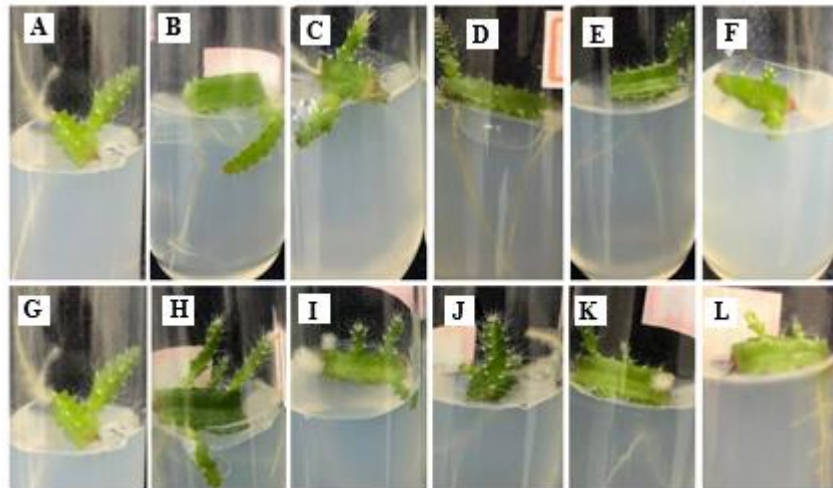
Para a extração dos pigmentos, foram utilizados 0,1 g de matéria fresca dos cladódios e homogeneizadas com 5 mL de acetona 80% (v/v), filtrados em lã de vidro, completando-se o volume para 10 mL de acetona 80%. Imediatamente após este procedimento, foi realizada a leitura da absorbância a 663,2 nm, 646,8 nm e 470nm. Todo o procedimento foi realizado no escuro para evitar a degradação das clorofilas. Os teores clorofila e carotenoides foram calculados seguindo as seguintes equações: clorofila *a* [(12,25 x A663,2) – (2,79 x A646,8)]; clorofila *b* [(21,5 x A646,8) – (5,1 x A663,2)]; clorofila total (*a+b*) e carotenoides [((1000 x A470) – (1,82 x A663,2) – (85,02 x A646,2))/198], sendo os resultados expressos em mg de pigmento por g de matéria fresca de tecido do cladódio. Foram selecionados alguns tratamentos mais discrepantes para essa análise, tratamento contendo 36 e 48 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de selenato, 12 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de selenito e a testemunha, com 3 repetições em triplicatas para cada tratamento, tanto para plantas coletadas na cultura de tecidos aos 49 dias como para as plantas coletadas aos 150 dias em casa de vegetação.

O método empregado para testes de média foi a análise de variância ($P < 0,05$) dos modelos de regressão linear e quadrática para concentração de selenito e selenato em laboratório e em casa de vegetação, utilizando o software RStudio (2012). Os gráficos apresentados são suavizações de regressão local (LOWESS -Locally Weighted Scatterplot Smoothing) (CHAMBERS E HASTIE, 1991).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O comportamento do crescimento das plantas foi bastante próximo em todos os tratamentos (Figura 1), porém nos tratamentos com adição de 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de selenato e selenito as plantas apresentaram desenvolvimento um pouco menor.

Figura 1 - Plântulas de pitaia (*Hylocereus polyrhizus*) aos 49 dias de cultivo, submetidos a diferentes concentrações de selenato e selenito. A: testemunha, B: 12 $\mu\text{mol L}^{-1}$, C: 24 $\mu\text{mol L}^{-1}$, D: 36 $\mu\text{mol L}^{-1}$, E: 48 $\mu\text{mol L}^{-1}$, F: 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ broto bem pequeno. G: testemunha, H: 12 $\mu\text{mol L}^{-1}$, I: 24 $\mu\text{mol L}^{-1}$, J: 36 $\mu\text{mol L}^{-1}$, K: 48 $\mu\text{mol L}^{-1}$, L: 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$.



Fonte: Da autora (2020).

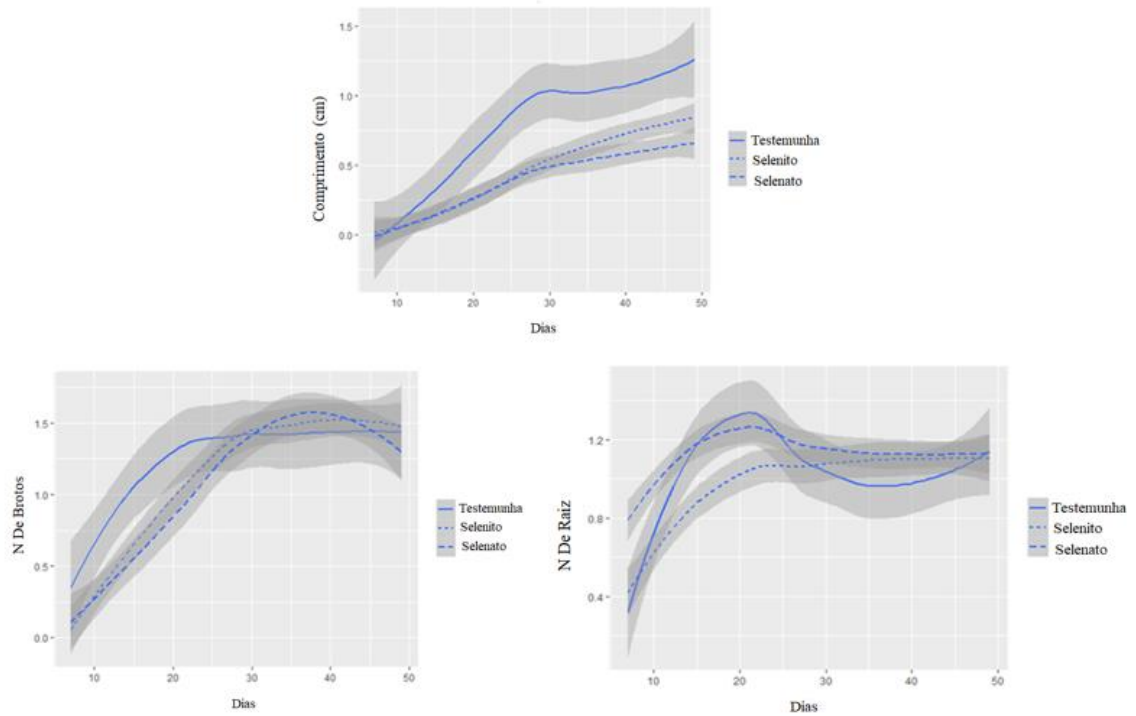
O resultado das avaliações semanais resultou no gráfico do comportamento do crescimento das plantas que demonstrou o esperado. A medida que o tempo se passou as plantas tiveram o seu crescimento aumentado, porém, a testemunha obteve crescimento um pouco maior durante todo o período avaliado que as fontes de selênio selenito e selenato.

Quanto ao número de brotos, no início dos dias avaliados, a testemunha se sobressaiu aos tratamentos com adição de selênio. No entanto, aos 35 dias houve um comportamento contrário, onde a testemunha atingiu menor número de brotos, devido ao fato de que desde os 21 dias obteve estabilidade em quantidade.

Observa-se também queda do número de brotos produzidos com adição de selenato a partir dos 41 dias e nota-se que quando se utilizou selenito, a partir de 28 dias houve estabilidade na quantidade de brotos. Ressalta-se que a distribuição dos dados das fontes de selênio e da testemunha foram muito próximas ao longo do tempo, esse fato é relevante pois a pitaia pode ser cultivada com a adição de fontes de selênio sem prejuízo em emissão de brotações.

Para o número de raízes, aos 21 dias havia destaque para a testemunha, porém a fonte selenato teve um comportamento bem parecido. Aos 49 dias no final da avaliação, tanto a testemunha quanto as fontes se igualaram em número de raiz (Figura 2), demonstrando que a adição de selênio não afeta o enraizamento das plantas de pitaia.

Figura 2 - Comprimento de plantas, número de brotos, número de raiz de pitaias cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de selenato e selenito de sódio ao longo do tempo, avaliadas a cada sete dias.



Fonte: Da autora (2020).

Aos 49 dias, momento em que as plantas foram levadas para a casa de vegetação, as variáveis número de brotos, comprimento da raiz e número de raízes não foram significativas, enquanto comprimento dos brotos, e matéria fresca e seca foram significativas (Tabela 1).

TABELA 1 – Resumo da análise de variância (Anova) para log de: número de raízes (NR L), número de brotos (NB L), comprimento de brotos (CB L) (cm), matéria fresca (MF L) (mg), matéria seca (MS L) (mg), aos 49 dias de cultivo *in vitro*. Comprimento de brotos (CB CV) (cm), número de brotos (NB CV), diâmetro de brotos (DB CV) (cm) aos 150 dias em casa de vegetação. Acúmulo de selênio (AC L) (μg) aos 49 dias de cultivo *in vitro* e aos 150 dias em casa de vegetação (AC CV) (μg), atividade enzimática de ascorbato peroxidase (APX L), catalase (CAT L) e superóxido dismutase (SOD L) em laboratório aos 49 dias de cultivo *in vitro* e em casa de vegetação aos 150 dias (APX CV), (CAT CV), (SOD CV) (u). Teor de clorofila a (CA L), clorofila b (CB L), carotenoides (CAR L) e clorofila total (CT L) em laboratório aos 49 dias de cultivo *in vitro* e em casa de vegetação aos 150 dias (CA CV), (CB CV), (CARO CV), (CT CV) (mg/g de MS).

Variáveis em estudo	Fontes de variação			
	Fontes	Doses	Dose ²	Fonte: Dose
NR L	0,1171	0,8674	0,3888	1,6213
NB L	2,982	0,1674	0,0902	2,7360
CB L	1,0703	15,4278**	0,1852	5,8050
MF L	0,1941	7,8905*	0,0128	0,0524
MS L	2,8089	9,3499*	0,9558	15,7702**
CB CV	2,1230	0,9955	1,2168	0,6683
NB CV	0,0008	3,7029	0,3958	1,2701
DB CV	1,6126	2,0739	0,3310	0,0928
AC L	1799,2392**	19,0758*	2,2164	2,0250
AC CV	32,855*	5,1725	12,5056	15,6506
APX L	8,4146*	0,6830	0,0005	1,4173
CAT L	25,491**	19,846**	37,890**	48,589**
SOD L	5,2787	0,0149	7,4555	5,7958
APX CV	5,1106	1,2946	0,3567	0,4147
CAT CV	1,4556	2,5046	12,4041*	3,0452
SOD CV	8,2195*	0,4317	0,000	2,9122
CA L	468,127**	378,945**	51,406**	-
CB L	131,548**	106,357**	19,599**	-
CAR L	289,004**	233,355**	44,681**	-
CT L	349,023**	283,685**	40,629**	-
CA CV	7,3115**	13,7514**	18,2674**	-
CB CV	1,6323	2,9967	3,0033	-
CAR CV	6,3542*	19,0748**	19,3499**	-
CT CV	4,2821*	8,8161*	10,8964**	-

*Significativo na análise sequencial a 5% de probabilidade pelo teste F.

**Significativo na análise sequencial a 1% de probabilidade pelo teste F.

Fonte: Da autora (2020).

Na análise sequencial dos caracteres com diferença significativa foi realizado o teste t para indicar o aumento ou diminuição das fontes selenito e selenato e suas concentrações e interações (Tabela 2).

Tabela 2 – Estimativa do teste t para comparação entre médias de tratamentos para: comprimento de brotos (CB L) (cm), matéria fresca (MF L) (mg), matéria seca (MS L) (mg), aos 49 dias de cultivo *in vitro*. Número de brotos (NB CV) aos 150 dias em casa de vegetação. Acúmulo de selênio (AC L) (μg) aos 49 dias de cultivo *in vitro* e aos 150 dias em casa de vegetação (AC CV) (μg), atividade enzimática de ascorbato peroxidase (APX L), catalase (CAT L) aos 49 dias de cultivo *in vitro* e em casa de vegetação aos 150 dias de catalase (CAT CV) e superóxido dismutase (SOD CV) (u). Teor de clorofila a (CA L), clorofila b (CB L), carotenoides (CAR L) e clorofila total (CT L) em laboratório aos 49 dias de cultivo *in vitro* e em casa de vegetação aos 150 dias (CA CV), (CARO CV), (CT CV) (mg/g de MS).

Variáveis em estudo	Fontes de variação			
	Fontes	Doses	Dose ²	Fonte: Dose
CB L	-0,338	-0,600	0,421	-2,218
MF L	-0,333	-1,196	-0,406	-0,321
MS L	1,541	1,099	0,361	-3,762
TE L	44,905**	12,183**	-2,729	-0,086
AC L	16,754**	3,098	0,045	-0,084
AC CV	2,457	1,964	1,250	-0,529
APX L	-2,235	0,486	-1,058	-0,071
CAT L	-1,410	1,734	-0,589	-1,842
CAT CV	-2,800*	1,532	-2,505	-2,013
SOD CV	-0,692	-0,902	-1,589	1,371
CA L	8,715**	19,995**	-7,170**	-
CB L	3,667*	10,644**	-4,420*	-
CAR L	5,219**	15,778**	-6,684**	-
CT L	7,193**	17,314**	-6,374**	-
CA CV	1,603**	1,5581*	1,733*	-
CAR CV	4,060*	3,987*	4,399*	-
CT CV	3,448*	2,685	3,301*	-

*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste T.

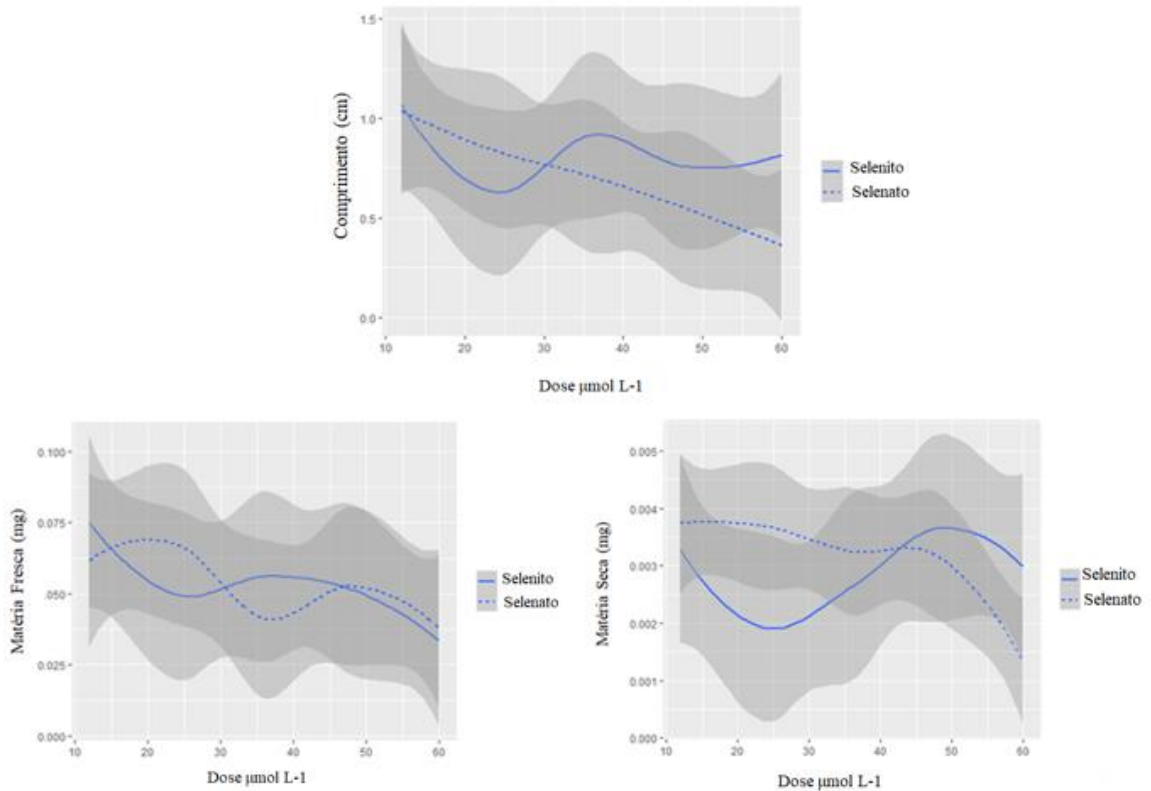
**Significativo a 1% de probabilidade pelo teste T.

Fonte: Da autora (2020).

Assim quando considerado o comprimento dos brotos ($p = 0,0002$), menores concentrações, como $12 \mu\text{mol L}^{-1}$ tanto de selenito como de selenato resultaram em maior comprimento de brotos. Já para a matéria fresca das plantas ($p = 0,0067$), a dose $12 \mu\text{mol L}^{-1}$

¹ de selenito resultou em maior acúmulo em mg ($p=0,0003$), como também quando considerada a matéria seca de plantas de pitaia a dose $12 \mu\text{mol L}^{-1}$ também resultou em maiores acúmulos, porém da fonte selenato (Figura 3).

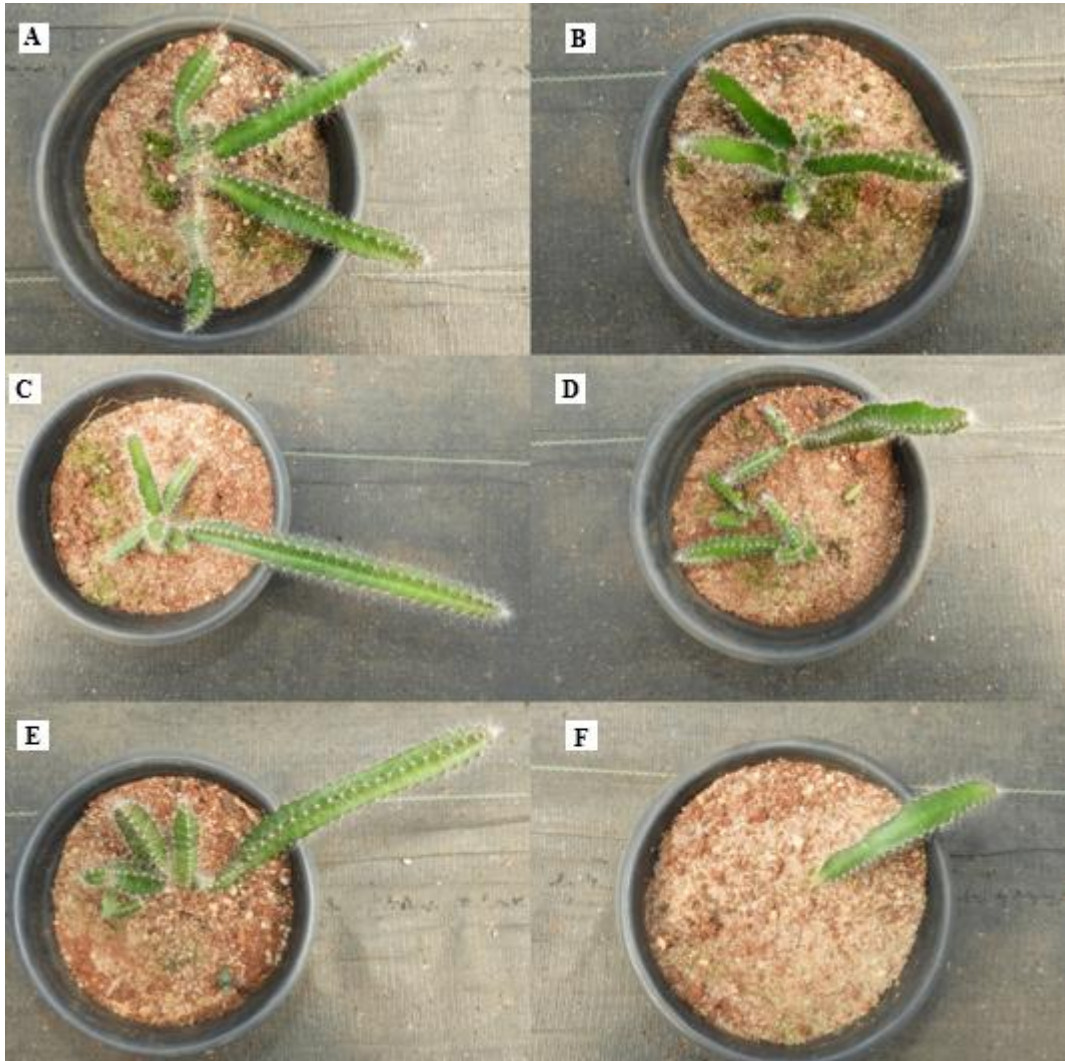
Figura 3 - Comprimento de brotos, matéria fresca e matéria seca de pitaia cultivadas *in vitro* aos 49 dias sob diferentes concentrações de selenato e selenito de sódio nas concentrações 0, 12, 24, 36, 48 e $60 \mu\text{mol L}^{-1}$.



Fonte: Da autora (2020).

Após 150 dias em casa de vegetação as plantas que receberam o selênio na forma de selenato já estavam bem desenvolvidas e com bastante brotos, exceto as que receberam o tratamento com $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ de selenato (Figura 4), essas apresentavam tamanho reduzido e não se desenvolveram bem em casa de vegetação.

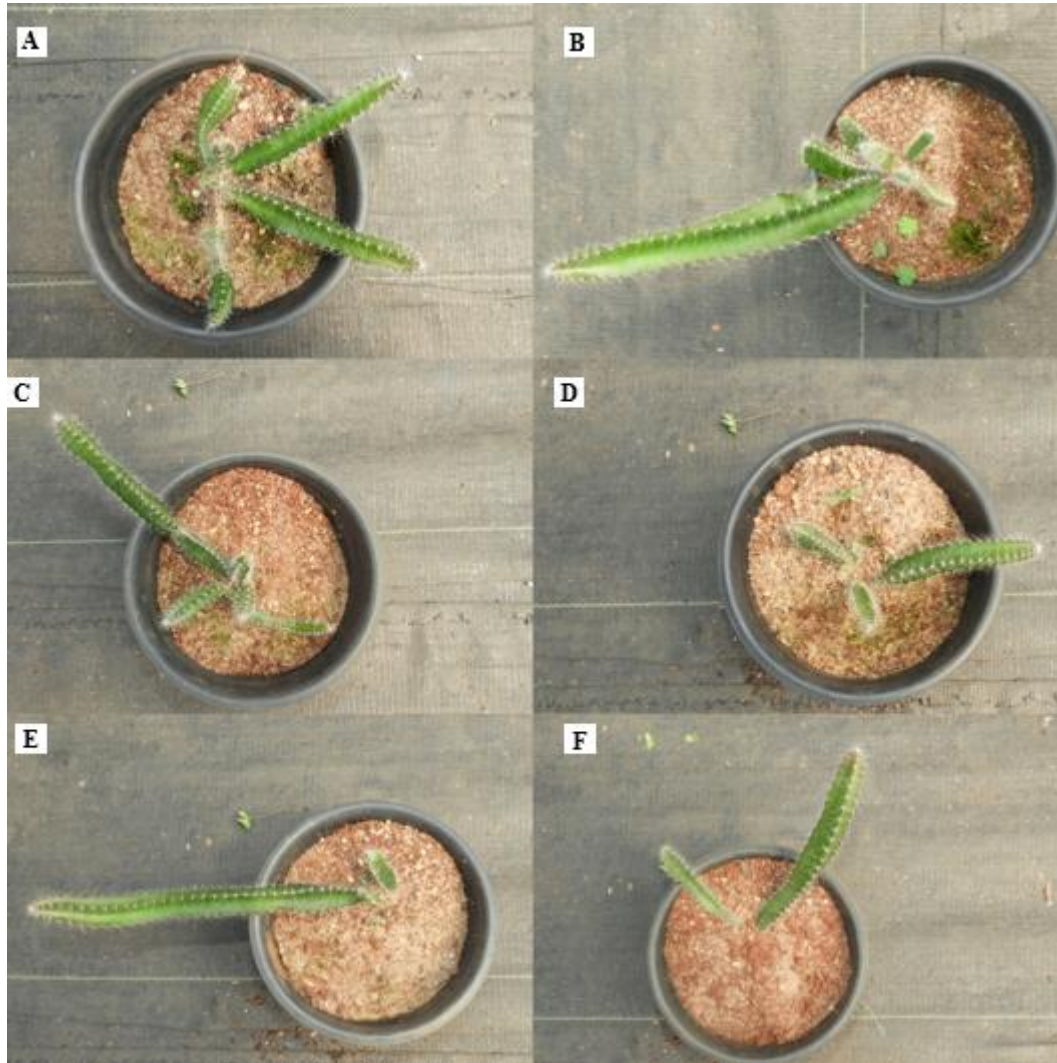
Figura 4 - Plantas de pitaia (*Hylocereus polyrhizus*) aclimatizadas com 150 dias de cultivo, após terem sido submetidos a diferentes concentrações de selenato *in vitro*. A: testemunha, B: $12 \mu\text{mol L}^{-1}$, C: $24 \mu\text{mol L}^{-1}$, D: $36 \mu\text{mol L}^{-1}$, E: $48 \mu\text{mol L}^{-1}$, F: $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ apenas um broto.



Fonte: Da autora (2020).

As plantas que receberam a fonte de selênio na forma de selenito também tiveram bom desenvolvimento (Figura 5).

Figura 5 - Plantas de pitaia (*Hylocereus polyrhizus*) aclimatizadas com 150 dias de cultivo, após terem sido submetidas a diferentes concentrações de selenito *in vitro*. A: testemunha, B: 12 $\mu\text{mol L}^{-1}$, C: 24 $\mu\text{mol L}^{-1}$, D: 36 $\mu\text{mol L}^{-1}$, E: 48 $\mu\text{mol L}^{-1}$, F: 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$.



Fonte: Da autora (2020).

O comprimento, o número de brotos e o diâmetro dos brotos avaliados em casa de vegetação não foram significativos estatisticamente.

Em relação a quantificação de selênio é importante ressaltar que em laboratório as plantas continham altas doses desse elemento, doses estas maiores que em casa de vegetação (Tabela 3), demonstrando a diluição desse elemento a medida que as plantas se desenvolveram. Foi observado que mesmo após a mudança de ambiente e mesmo as plantas não estando mais em contato com a fonte de selênio, o elemento permaneceu presente em sua composição.

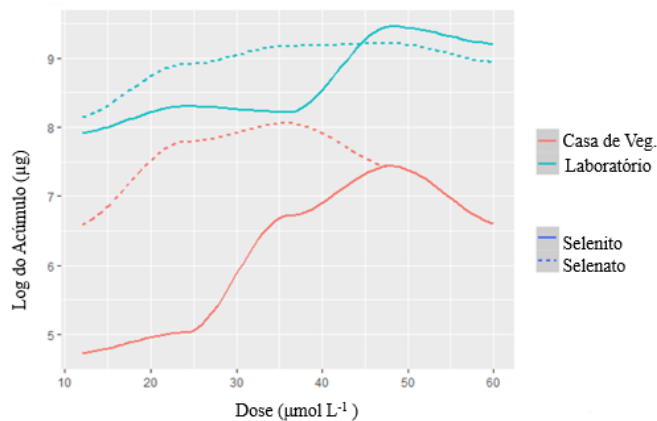
Tabela 3 – Acúmulo de selênio: selenato e selenito respectivamente, em plantas cultivadas *in vitro* e 150 dias após aclimatização em casa de vegetação ($\mu\text{g MF}$).

Tratamentos	Laboratório	Casa de vegetação
0	0	0
12	3435	725
24	7412	2407
36	9651	3163
48	10017	1643
60	7613	-
0	0	0
12	2745	113
24	4031	152
36	3703	823
48	12773	1700
60	9917	733

Fonte: Da autora (2020).

Após 49 dias as plantas *in vitro* acumularam em seus cladódios mais selênio quando submetidas a fonte de selênio selenito ($p= 1,38e-07$) especificamente na dose 48 $\mu\text{mol L}^{-1}$ porém só houve diferença significativa entre fontes de selênio. Já quando essas plantas foram aclimatizadas o selenato ($p= 1,38e-05$) foi a fonte de selênio mais acumulada nos cladódios de pitaita, onde o maior valor (3.163 $\mu\text{g MF}$) foi encontrado na dose 36 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 6). Ressalta-se que na dose 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ houve fitotoxidez nas plantas e não houve material suficiente para quantificar o acúmulo do elemento.

Figura 6 - Gráfico do log acúmulo de selênio em pitaitas cultivadas *in vitro* com adição de duas fontes de selênio: selenato de sódio – Na_2SeO_4 – e selenito de sódio – Na_2SeO_3 , nas concentrações 0, 12, 24, 36, 48 e 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e aclimatizadas em casa de vegetação após 150 dias.

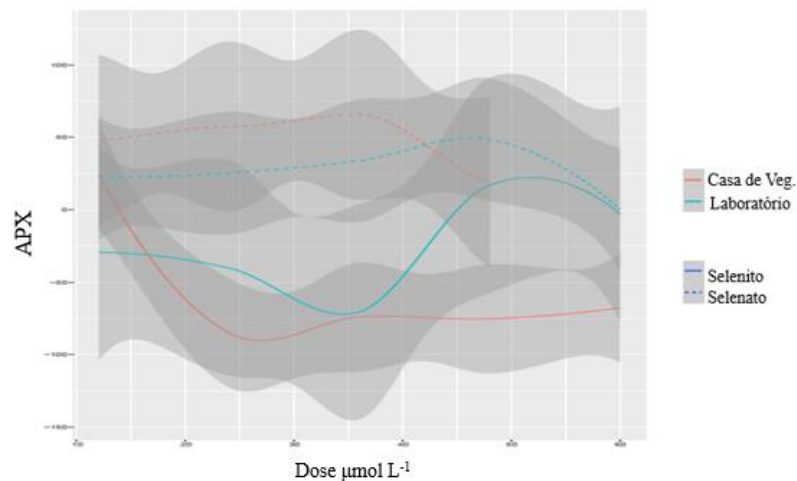


Fonte: Da Autora (2020).

Quando o intuito é o acúmulo ao longo do tempo buscando o completo desenvolvimento das plantas, quanto maiores doses acumuladas que não prejudiquem o seu crescimento melhor, visto que esse acúmulo vai sendo diluído como demonstrado após 150 dias em diferentes ambientes (Figura 6) e nota-se também que a diluição do selênio aplicado na forma de selenito foi bem maior que na fonte selenato.

Considerando o complexo enzimático antioxidante das plantas em laboratório, houve diferença significativa para as enzimas APX ($p=0,0013$) onde a fonte selenato foi superior (Figura 7).

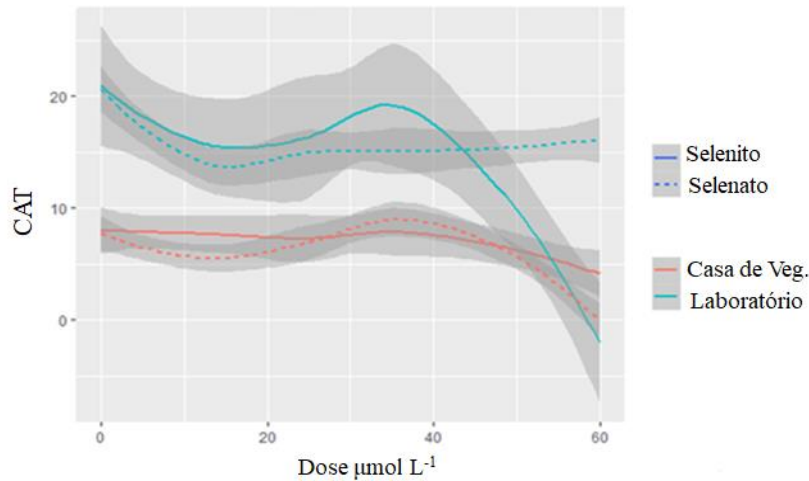
Figura 7 - Atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) em plantas de pitaiá cultivadas *in vitro* aos 49 dias, com adição de duas fontes de selênio: selenato de sódio – Na_2SeO_4 – e selenito de sódio – Na_2SeO_3 , nas concentrações 0, 12, 24, 36, 48 e 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e aclimatizadas em casa de vegetação após 150 dias.



Fonte: Da autora (2020).

Também houve diferença significativa nessa circunstância para a enzima CAT ($p=0,0030$) onde a fonte selenito na dose 36 $\mu\text{mol L}^{-1}$ apresentou sua maior atividade (Figura 8).

Figura 8 - Atividade da enzima catalase (CAT) em plantas de pitaia cultivadas *in vitro* aos 49 dias, com adição de duas fontes de selênio: selenato de sódio – Na_2SeO_4 – e selenito de sódio – Na_2SeO_3 , nas concentrações 0, 12, 24, 36, 48 e 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e aclimatizadas em casa de vegetação após 150 dias.

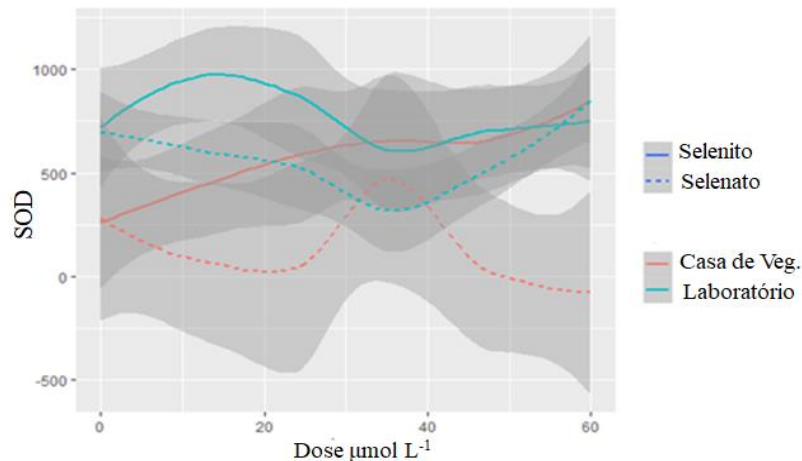


Fonte: Da autora (2020).

Após 150 dias em casa de vegetação houve diferença para as enzimas CAT e SOD. Para a catalase (CAT) ($p= 0,0095$), as duas fontes de selênio se encontraram muito próximas, porém o selenato foi superior com destaque para a dose 36 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 8).

Considerando a enzima superóxido dismutase (SOD) ($p= 0,0017$), as fontes de selênio se diferiram apenas em casa de vegetação, sendo que a fonte selenito gerou maior atividade enzimática (Figura 9).

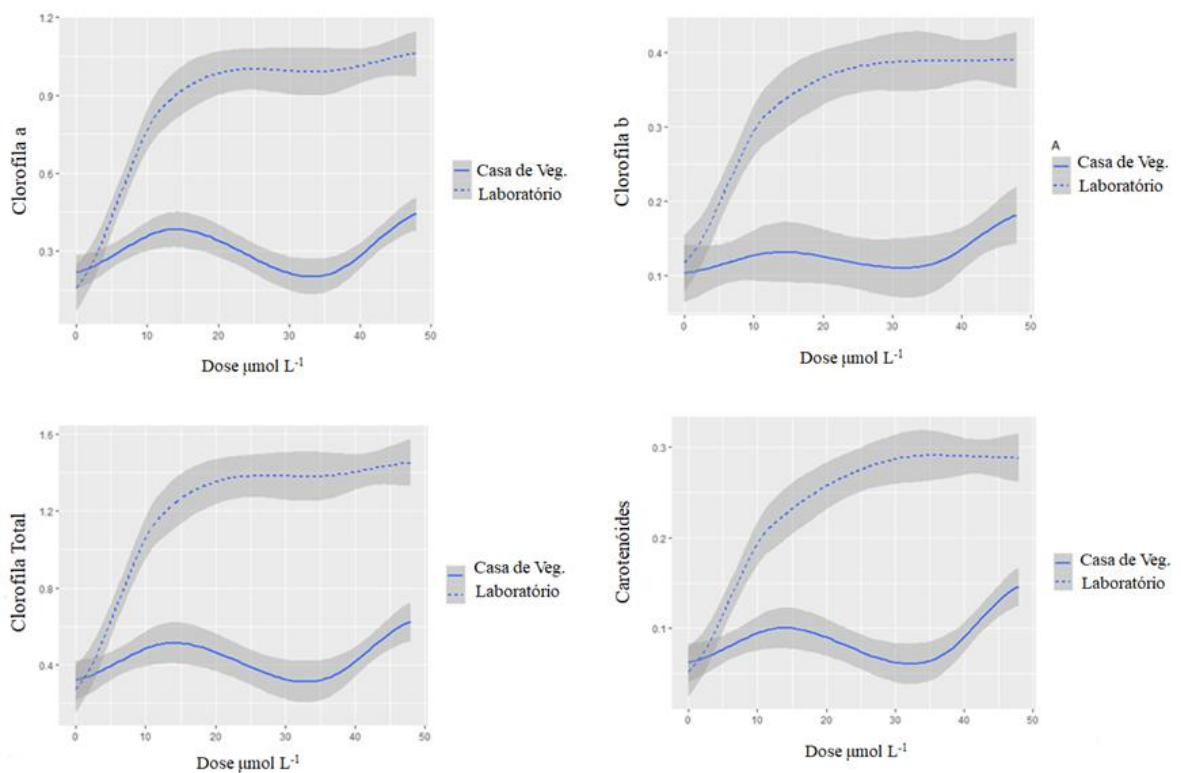
Figura 9 - Atividade da Superóxido dismutase (SOD) em plantas de pitaia cultivadas *in vitro* com adição de duas fontes de selênio: selenato de sódio – Na_2SeO_4 – e selenito de sódio – Na_2SeO_3 , nas concentrações 0, 12, 24, 36, 48 e 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e aclimatizadas em casa de vegetação após 150 dias.



Fonte: Da autora (2020).

Quando analisados os pigmentos fotossintéticos avaliados houve comportamento parecido, tanto em laboratório quanto em casa de vegetação (Figura 10). Apenas para a clorofila b em casa de vegetação não houve diferença significativa.

Figura 10 - Quantidade de pigmento fotossintético: clorofila *a*, *b*, total e carotenóides em plantas de pitaia cultivadas *in vitro* aos 49 dias e em casa de vegetação aos 150 dias, com adição de 12 $\mu\text{mol L}^{-1}$ selenito de sódio – Na_2SeO_3 e de 36 e 48 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de selenato de sódio – Na_2SeO_4 – e uma testemunha.



Fonte: Da autora (2020).

Em laboratório os tratamentos contendo selênio apresentaram maiores teores de clorofila *a* ($p= 1,82e-05$) e clorofila total ($p= 5,27e-05$) no tratamento contendo 48 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de selenato e este tratamento foi estatisticamente igual ao tratamento 36 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de selenato quando considerada clorofila *b* ($p= 0,0010$) e carotenoides ($p= 3,45e-05$).

Em casa de vegetação o tratamento contendo 48 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de selenato obteve maiores teores de todos os pigmentos significativos: clorofila *a* ($p= 0,0013$), carotenoides ($p= 0,0010$) e clorofila total ($p= 0,0070$).

Observa-se que a quantificação de selênio se associa as avaliações dos pigmentos fotossintéticos, como do complexo enzimático e dos resultados fitotécnicos. Quanto a esse

último pode ocorrer que uma planta que recebeu quantidade excessiva de selênio demore muito mais para crescer e se desenvolver que outra que recebeu menores quantidades desse elemento, como pôde ser observado nos dados referentes à matéria fresca, seca e comprimento, em que plantas cultivadas sob dose $12 \mu\text{mol L}^{-1}$ obtiveram melhores resultados, e plantas que receberam doses extremas como $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ apresentaram menor desempenho nas variáveis e no caso da fonte selenato apresentaram até fitotoxidez.

Desta forma pode-se inferir que a pitiaia por ser uma planta bastante resistente e de metabolismo diferenciado resistiu bem as doses utilizadas até certo ponto e não foi identificada uma dose letal.

Versini et al. (2016) comenta que as plantas de diversas espécies aproveitam a mobilidade do selenato e a capacidade de armazenamento de vacúolos de folhas para contornar a toxicidade do selênio. Por outro lado, o incremento do conteúdo de selênio em tecidos vegetais pode resultar em diminuições na biomassa em diversas culturas quando acumulado em níveis acima de 5 mg g^{-1} (SMITH e WATKINSON, 1984). Sabe-se também que concentrações de Selênio consideradas tóxicas se associam a perda em 10% na matéria seca total de plantas que não são acumuladoras (MIKKELSEN e WAN, 1990).

Destaca-se que doses intermediárias como a de $36 \mu\text{mol L}^{-1}$ mantêm as plantas fitotecnicamente bem desenvolvidas e ao mesmo tempo acumulam doses elevadas de selênio após aclimatização, podendo ter potencial de manter uma quantidade razoável desse elemento até a produção de frutos, visto que a dose diária recomendada para ingestão de selênio é de no máximo $40 \mu\text{g dia}^{-1}$, quantidade essa, cerca de 100 vezes menor que a encontrada na planta.

Dutra (2017), trabalhando em ambiente protegido com plantas de couve-flor cultivadas em sistema hidropônico sob concentrações de Se ($0, 5, 15, 30$ e $60 \mu\text{mol L}^{-1}$) com as fontes selenato e selenito de sódio, verificou que o teor do elemento na inflorescência da couve-flor foi superior ao limite máximo admitido pelo *Codex Alimentarius*, e o acúmulo de Se nas plantas submetidas ao selenato foi maior que submetidas ao selenito.

Em trabalhos como o de Ramos et al. (2011), Silva et al. (2018) e Hawrylak e Szymańska (2004) o selenato também promoveu maior acúmulo de selênio não comprometendo a parte aérea, neste último menores doses refletiram em maior aumento em matéria fresca, corroborando com os resultados deste trabalho.

Em cactáceas aparentadas com a pitiaia conhecidas como palma, três cultivares foram submetidas a altas quantidades de selênio via substrato. O acúmulo do elemento foi

menor em frutos do que nos cladódios (38 vezes maior em frutos e 170 vezes maior em cladódios que em solo comum) (BAÑUELOS et al., 2012), o que demonstra que os cladódios da pitáia são órgãos muito eficientes em fixar selênio e uma alternativa para o descarte de mudas de pitáia pelas podas em campo poderia ser sua utilização como farinha na merenda escolar quando enriquecidas com selênio.

Zhu et al. (2017), ao trabalhar com biofortificação no campo de uva de mesa com Se, comenta que frutas enriquecidas com esse elemento estão se tornando cada vez mais populares além de melhorar a qualidade das uvas. O que ocorre também com as pitáias, no qual suas mudas adquirem maior resistência a estresses abióticos.

Jing et al. (2017) comenta que o (Se) afeta a composição química e propriedades antioxidantes das plantas e explica que em concentrações apropriadas, ele age como antioxidante ou ativa mecanismos que podem aliviar o estresse oxidativo no cloroplasto e promove o crescimento das plantas e Dutra (2017) observou que o selenato, pode contribuir para inibir a produção dessas espécies reativas de oxigênio.

Kapoor et al. (2012) ao trabalhar com alho *in vitro* com adição de selênio por meio da fonte selenito constatou aumento da atividade de Superóxido dismutase e catalase em todos os tecidos cultivados *in vitro* na concentração de 4 mg L⁻¹. Já Babalar et al. (2019) e Lessa et al. (2019) em campo observaram que o selênio teve influência sobre a atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e APX), esse último autor ainda comenta que esse fato indica um papel importante na proteção das plantas.

O Se também modifica a biossíntese de clorofilas sendo capaz de gerar incremento na concentração desses pigmentos (AKLADIOUS 2012) estimulando as taxas de respiração e a fluxo de elétrons na cadeia respiratória (GERM; KREFT; OSVALD, 2005) e protegendo as enzimas cloroplásticas (PENNANEN; XUE; HARTIKAINEN, 2002).

O acréscimo de clorofila e fotossíntese também causa complemento no conteúdo de carboidratos em plantas cultivadas com Se (SHAHZADI et al., 2017), resultando em maior crescimento, acúmulo de biomassa e produtividade, por meio de uma maior disponibilidade de substratos para formação de energia e compostos orgânicos (MALIK et al., 2010; NAWAZ et al., 2014).

4 CONCLUSÕES

A fonte de selênio selenato na concentração 36 µmol L⁻¹ é a mais indicada para a obtenção de plantas com maiores acúmulos de selênio, sem acarretar prejuízos em

caracteres fitotécnicos, complexos enzimáticos e fotossintetizante em pitaias de polpa vermelha variedade cebra após cultivo *in vitro* seguida de aclimatização.

A técnica de cultura de tecidos pode ser utilizada como uma nova vertente para a biofortificação visto que as plantas após 150 dias de aclimatização ainda continham quantidade significativa de selênio nos seus cladódios que são comestíveis.

REFERÊNCIAS

- AKLADIOUS, S. A. Influence of different soaking times with selenium on growth, metabolic activities of wheat seedlings under low temperature stress. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 82, p. 14792-14804, 2012.
- ANDRADE F. R. et al. O selênio protege as plantas de arroz do estresse hídrico. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v:164, p. 562-570, 2018.
- BABALAR, M. et al. Effect of foliar application with sodium selenate on selenium biofortification and fruit quality maintenance of ‘Starking Delicious’ apple during storage. **Science Food Agriculture**, v. 99, p. 5149-5156, 2019.
- BAÑUELOS, G. S. et al. Biofortified, selenium enriched, fruit and cladode from three *Opuntia* Cactus pear cultivars grown on agricultural drainage sediment for use in nutraceutical foods. **Food chemistry**, v. 135, n. 1, p. 9-16, 2012.
- 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**, v. 116, n. 2, p. 651-658, 1998.
- CAETANO NUNES, D. G. et al. Estandarización de un protocolo de regeneración *in vitro* para pitahaya amarilla (*selenicereus megalanthus* (k. schum. ex vaupel) moran). **Acta Agronómica**, v. 63, n. 1; p. 31-41, 2014.
- CHAMBERS, J. M.; HASTIE, T. J. Statistical models. In: **Statistical Models in S**. Routledge, 1991. p. 13-44.
- CORDEIRO, M. H. M. et al. Caracterização física, química e nutricional da pitaya-rosa de polpa vermelha. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 1, p. 20-26, 2015.
- DUTRA, A. F. **Selênio no desempenho fisiológico e biofortificação agrônômica da couve-flor**. Tese doutorado em Agronomia (Ciência do Solo) - Universidade Estadual Paulista, Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2017.
- FENG, R.; WEI, C.; TU, S. The roles of selenium in protecting plants against abiotic stresses. **Environmental and Experimental Botany**, v. 87, p. 58-68, 2013.
- GARCÍA-CRUZ, L., et al. Physical, chemical, and antioxidant activity characterization of pitaya (*Stenocereus pruinosus*) fruit. **Plant Foods Human Nutrition**, v. 68, n. 4, p. 403-410, 2013.
- GERM, M., KREFT, I., OSVALD, J. Influence of UV-B exclusion and selenium treatment on photochemical efficiency of photosystem II, yield and respiratory potential in pumpkins (*Cucurbita pepo* L.). **Plant physiology and Biochemistry**, v. 43, n. 5, p. 445-448, 2005.
- GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. **Plant physiology**, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.

GUILLIN, O. M. et al. Selenium, selenoproteins and viral infection. **Nutrients**, v. 11, p. 2101, 2019.

HARTHILL, M. Micronutrient selenium deficiency influences evolution of some viral infectious diseases. **Biological trace element research**, v. 143, n. 3, p. 1325-1336, 2011.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Regulation of catalase activity in leaves of *Nicotiana sylvestris* by high CO₂. **Plant Physiology**, v. 89, n. 3, p. 952-957, 1989.

HAWRYLAK, B.; SZYMAŃSKA, M. Selenium as a sulphhydrylic group inductor in plants. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 9, p. 329-336, 2004.

IVORY, K. et al. Selenium supplementation has beneficial and detrimental effects on immunity to influenza vaccine in older adults. **Clinical nutrition**, v. 36, n. 2, p. 407-415, 2017.

JING, D. et al. Selenium enrichment, fruit quality and yield of winter jujube as affected by addition of sodium selenite. **Scientia Horticulturae**, v. 225, p. 1-5, 2017.

JUÁREZ-CRUZ A. et al. Composición química de tallos inmaduros de *Acanthocereus* spp. e *Hylocereus undatus* (Haw.) Britton & Rose. **Revista Fitotecnia Mexicana**. v. 35, p. 171-175, 2012.

KAPOOR, R. et al. Selenium treatment alters phytochemical and biochemical activity of in vitro-grown tissues and organs of *Allium sativum* L. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 48, n. 4, p. 411-416, 2012.

LE BELLEC, F; VAILLANT, F; IMBERT, E. Pitahaya (*Hylocereus* spp.): a new fruit crop, a market with a future. **Fruits**, v. 61, n. 4, p. 237-250, 2006.

LESSA, J. H. L. et al. Agronomic biofortification of rice (*Oryza sativa* L.) with selenium and its effect on element distributions in biofortified grains. **Plant and Soil**, v. 441 p. 1-12, 2019.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. **Current protocols in food analytical chemistry**, v. 1, n. 1, p. F4. 3.1-F4. 3.8, 2001.

LOPES, C. A. et al. Indução de calos, potencial embriogênico e estabilidade genética em pitaia vermelha. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 11, n. 1, p. 21-25, 2016.

LOUREIRO, M. P. et al. Biofortificação de alimentos: problema ou solução?. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 25, n. 2, p. 66-84, 2018.

MAGGINI, S; PIERRE, A; CALDER, P.C. Immune function and micronutrient requirements change over the life course. **Nutrients**, v. 10, p. 1531, 2018.

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**, v. 143, n. 1, p. 530-539, 2011.

MIKKELSEN, R. L.; WAN, H. F. The effect of selenium on sulfur uptake by barley and rice. **Plant and Soil**, v. 121, n. 1, p. 151-153, 1990.

MOREIRA, R. A. **Microenzertia de *Selenicereus megalanthus* em diferentes porta-enxertos de pitaia**. 2018. 45 p. Dissertação (Mestrado Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NAKANO, Y., ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiologic**, v. 22, p. 867-880, 1981.

NATASHA, N. et al. A critical review of selenium biogeochemical behavior in soil-plant system with an inference to human health. **Environmental Pollution**, v. 234, p. 915-934, 03/01 2018.

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

OLIVEIRA, L. S.; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, n. 76, p. 439-453, 2013.

OSUNA-PADILLA, Ivan Armando et al. Zinc and selenium indicators and their relation to immunologic and metabolic parameters in male patients with human immunodeficiency virus. **Nutrition**, v. 70, p. 110585, 2020.

PENNANEN, A.; XUE, T.; HARTIKAINEN, H. Protective role of selenium in plant subjected to severe UV irradiation stress. **Journal of applied botany**, v. 76, n. 1-2, p. 66-76, 2002.

POLANSKY, H.; LORI, G. Coronavirus (COVID-19), First Indication of Efficacy of Gene-Eden-VIR/Novirin in SARS-CoV-2 Infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2020.

PUCCINELLI, M.; MALORGIO, F.; PEZZAROSSA, B. Selenium enrichment of horticultural crops. **Molecules**, v. 22, n. 6, p. 933, 2017.

RAMOS, S. J. et al. Selenato e selenito na produção, nutrição mineral e biofortificação com selênio em cultivares de alface. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, p. 1347-1355, 2011.

RUSSELL, R. M. et al. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. **A Report of the Panel on Micronutrients, Subcommittees on Upper Reference Levels of Nutrients and of Interpretation and Uses of Dietary Reference Intakes, and**

the Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes Food and Nutrition Board Institute of Medicine, 2001.

SILVA, M. M. A.; FERREIRA, L. T. Cultivo *in vitro* de plantas e suas aplicações em cactáceas. Campina Grande: **INSA**, 2016.

SILVA, E. D. N. D. et al. Effect of selenite and selenate application on mineral composition of lettuce plants cultivated under hydroponic conditions: Nutritional balance overview using a multifaceted study. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, p. 371-379, 2018.

SHAHZADI, I., et. al. Foliar application of selenium increases fertility and grain yield in bread wheat under contrasting water availability regimes. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 39, n. 8, p. 173, 2017.

SMITH, G. S.; WATKINSON, J. H. Selenium toxicity in perennial ryegrass and white clover. **New Phytologist**, v. 97, n. 4, p. 557-564, 1984.

STEINBRENNER, H. et al. Dietary selenium in adjuvant therapy of viral and bacterial infections. **Advances in Nutrition**, v. 6, p. 73-82. 2015.

STUDIO, R. R. Studio: integrated development environment for R. RStudio **Inc, Boston, Massachusetts**, 2012.

TINDADE, A. et al. Pitaia: perspectivas e dificuldades de uma “nova” cultura. **Agrotecnologia**, v. 30, p. 32-34, 2019.

USEPA (2007) Microwave assisted acid digestion of sediments sludge, soils, and oils. EPA SW 846:3051A, **Washington, DC**, 2007.

US-CAMAS, R. et al. *In vitro* culture: an epigenetic challenge for plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 118, n. 2, p. 187-201, 2014.

VERGÜTZ, L, et al. Biofortificação de alimentos: saúde ao alcance de todos. **Boletim Informativo da SBCS**; v. 42, 20-23, 2016.

VERSINI, A. et al. Influence of Se concentrations and species in hydroponic cultures on Se uptake, translocation and assimilation in non-accumulator ryegrass. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 108, p. 372-380, 2016.

ZHU, S. et al. Spraying foliar selenium fertilizer on quality of table grape (*Vitis vinifera* L.) from different source varieties. **Scientia Horticulturae**, v. 218, p. 87-94, 2017.

CAPÍTULO 3 - RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E ANATÔMICAS DE PLANTAS DE PITAIA SOB ADIÇÃO DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS *in vitro* E APÓS ACLIMATIZAÇÃO

RESUMO

A pitiaia é uma frutífera com destaque econômico, sendo uma nova vertente para os adeptos da saudabilidade em razão de sua ação antioxidante e presença de nutrientes. A sua propagação pode ser feita por meio da micropropagação, técnica *in vitro* na qual é utilizado meio de cultura, possibilitando o seu enriquecimento com substâncias húmicas, substâncias essas que podem substituir os reguladores sintéticos para o desenvolvimento das plantas. Sendo assim, objetivou-se avaliar o efeito de diferentes fontes de substâncias húmicas (ácidos húmicos e ácidos fúlvicos) e suas concentrações (0, 5, 10, 20 e 40 mg L⁻¹) e seus efeitos sobre o crescimento, variáveis fisiológicas e anatômicas em plantas cultivadas *in vitro* e aclimatizadas, tendo em vista o melhor desempenho e tolerância em pitaias vermelhas (*Hylocereus polyrhizus*). Foram utilizadas cinco repetições (10 tubos/repetição) em delineamento inteiramente casualizado. Melhores desempenhos de mudas de pitiaia foram encontradas em plantas submetidas a concentração 20 mg L⁻¹ de ácido fúlvico e aclimatizadas após 150 dias, com um destaque para suas características de enraizamento e variáveis anatômicas, demonstrando o potencial do tratamento ao estímulo do crescimento.

Palavras-chave: *Hylocereus polyrhizus*. Pigmentos. Ácido fúlvico.

ABSTRACT

Pitaya is a fruit tree with an economic highlight, being a new aspect for the adepts of the healthiness due to its antioxidant action and presence of nutrients. Its propagation can be done through micropropagation, an *in vitro* technique which culture medium is used, enabling its enrichment with humic substances that can replace synthetic regulator for plant development. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of different sources of humic substances (humic acids and fulvic acids) and their concentrations (0, 5, 10, 20 e 40 mg L⁻¹) and their effects on growth, physiological and anatomical variables in plants cultivated *in vitro* and acclimatized, aiming better performance and tolerance in red pitayas (*Hylocereus polyrhizus*). Five replications (10 tubes/replications) were used in a completely randomized design. Better performances pitayas seedlings were found in plants submitted to a concentration of 20 mg L⁻¹ of fulvic acid and acclimatized after 150 days, with emphasis on their rooting characteristics and anatomical variables, demonstrating the potential of this treatment to stimulate growth.

Keywords: *Hylocereus polyrhizus*. Pigments. Fulvic acid.

1 INTRODUÇÃO

A pitaita é uma frutífera que tem se destacado em razão de seu elevado potencial nutricional, antioxidante (CHEN et al., 2019) e ainda, econômico, devido aos altos valores pagos pelo quilo da fruta (LOPES et al., 2016). A sua propagação é feita por meio de sementes ou propagação vegetativa por segmentos de cladódios, enxertos ou até mesmo *in vitro* (ORTIZ-HERNÁNDEZ e CARRILLO-SALAZAR, 2012).

A micropropagação é uma técnica de cultivo *in vitro* que permite a produção em larga escala comercial de material uniforme e livre de contaminações (CID e TEIXEIRA, 2014). Nessa técnica é usado como base de crescimento e absorção o meio de cultura, no qual podem ser adicionados fitorreguladores que auxiliam na sua multiplicação (OLIVEIRA; DIAS e BRONDANI, 2013) e nutrientes de acordo com as exigências da espécie, visando seu desenvolvimento (SILVA e FERREIRA, 2016).

Substâncias húmicas podem ser acrescentadas ao meio de cultivo, as quais têm ampla relação com o que a pesquisa e o mercado tem buscado na atualidade (CANELLAS et al., 2015).

Países como os da União europeia já tem restrições ao uso de produtos químicos, como as auxinas, na produção vegetal (WISZNIEWSKA et al., 2016) e as substâncias húmicas também representam uma boa opção nesse aspecto devido as suas propriedades, podendo substituir esses reguladores sintéticos de maneira mais ecologicamente correta e barata.

Essas substâncias também são capazes de aumentar a eficiência do uso de nutrientes, diminuir a incidência de doenças, ajudar a reduzir as taxas de aplicação de fertilizantes e estimular o crescimento radicular (CANELLAS et al., 2002).

As plantas submetidas a tratamentos contendo substâncias húmicas tem alto potencial de enraizamento, assim essas mudas tem um desenvolvimento mais rápido podendo ser levadas ao campo mais rapidamente diminuindo os custos do processo. Desta maneira há um reflexo na pós-aclimatização das plantas ocasionando em melhor tolerância as adversidades do campo.

Desta forma, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes fontes de substâncias húmicas (ácidos húmicos e ácidos fúlvicos) e suas concentrações sobre o crescimento, variáveis fisiológicas e anatômicas em plantas cultivadas *in vitro* e aclimatizadas, tendo em vista melhor desempenho de mudas de pitaitas vermelhas (*Hylocereus polyrizus*) variedade Cebra.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na cidade de Lavras – MG, Brasil, latitude 21°14' S, longitude 44°59' W, altitude 919 m e clima Cwa, no Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Os explantes utilizados foram advindos de plântulas da variedade cebrá, previamente germinadas e estabelecidas *in vitro* e constituídos por segmentos de um centímetro, cultivados em meio MS (MURASHIGE E SKOOG 1962) semissólido, acrescido de 25 g L⁻¹ de sacarose e 6 g L⁻¹ de ágar e pH ajustado para 5,7 ± 0,1 antes da autoclavagem. Foram utilizados tubos de ensaio contendo 15 mL de meio de cultura.

Os tratamentos consistiram em nove concentrações de substâncias húmicas (ácido húmico AH e fúlvico AF) nas concentrações 5, 10, 20 e 40 mg L⁻¹ e uma testemunha, com cinco repetições (10 tubos/repetição), em fatorial (5x2). Os tubos foram mantidos em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 1°C durante 45 dias.

Os ácidos utilizados foram produtos comerciais extraídos de leonardita, seguindo os métodos de extração e purificação propostos por Swift (1996). As principais propriedades dos materiais húmicos utilizados são descritas a seguir: condutividade elétrica (CE): 37,7 dS m⁻¹, pH: 9,7, razão E4 / E6: 4,84, C: 38%, N: 0,9% para o AH amostra; EC: 19,1 dS m⁻¹, pH: 5,6, razão E4 / E6: 7,35, C: 39%, N: 0,35% para a amostra de AF.

Após 45 dias foram avaliados os seguintes caracteres: comprimento do cladódio, largura do cladódio, número de brotos e raiz, comprimento raiz principal e matéria fresca e seca de parte aérea. Em seguida 20 plantas de cada tratamento foram aclimatizadas em casa de vegetação acondicionadas em bandejas contendo a mistura 1:1 de substrato comercial Plantmax® e areia. Após 150 dias foram avaliados: número, comprimento e diâmetro dos brotos e comprimento e número de raízes.

As análises anatômicas das raízes foram realizadas no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura (DAG). Amostras do terço superior das raízes foram coletadas de quatro plantas diferentes por tratamento, previamente fixadas e conservadas em álcool etílico 70% (v/v-1). As secções transversais foram obtidas à mão livre, com uso de lâmina de aço, em seguida submetidas a clarificação com hipoclorito de sódio (1%-1,25% de cloro ativo), tríplice lavagem em água destilada. Posteriormente, os cortes foram corados com solução safrablau (azul de astra 0,1% e safranina 1%). Em seguida, foram montadas em lâminas semipermanentes com água glicerizada (KRAUS e ARDUIN, 1997).

As lâminas foram observadas e fotografadas em microscópio óptico, modelo Olympus BX 60, acoplado à câmera digital Canon A630. As imagens foram analisadas em software, para análise de imagens Motic Images Plus 2.0, e foram analisadas 3 repetições de 3 imagens em cada um dos 9 tratamentos de plantas de casa de vegetação, para cada variável analisada. As variáveis estudadas foram: espessura da epiderme da raiz, espessura do xilema, córtex, medula e floema e área total da raiz.

Os pigmentos fotossintéticos analisados foram clorofila *a*, clorofila *b*, total e carotenoides. A extração foi realizada conforme metodologia descrita por Lichtenthaler e Buschmann (2001). As análises foram realizadas no Laboratório de Cultura de Tecidos (DAG/UFLA).

Para a extração dos pigmentos, foram pesados 0,1g de matéria fresca dos cladódios e homogeneizadas com 5 mL de acetona 80% (v/v), filtrados em lã de vidro, completando-se o volume para 10 mL de acetona 80%. Imediatamente após este procedimento, foi realizada a leitura da absorbância a 663,2 nm, 646,8 nm e 470nm. Todo o procedimento foi realizado no escuro para evitar a degradação das clorofilas. Os teores de clorofila e carotenoides foram calculados seguindo as seguintes equações: clorofila *a* [(12,25 x A663,2) – (2,79 x A646,8)]; clorofila *b* [(21,5 x A646,8) – (5,1 x A663,2)]; clorofila total (*a+b*) e carotenoides [((1000 x A470) – (1,82 x A663,2) – (85,02 x A646,2))/198], sendo os resultados expressos em mg de pigmento por g de matéria fresca de tecido do cladódio. Foram utilizados 3 repetições em triplicatas para cada tratamento de plantas de casa de vegetação com 150 dias de idade.

Para a quantificação de betacianinas, foram utilizados aproximadamente 200 mg de folhas e caule, macerados em 5 mL de água destilada seguido de centrifugação a 13.632 g, a 4°C por 25 minutos, segundo metodologia descrita por Cai et al. (1998). O conteúdo betacianina foi calculado de acordo com a fórmula: Teor de betacianina = Absorbância * FD * PManto * V * 100 ϵ x L x m. Foram utilizados 3 repetições em triplicatas para cada tratamento de plantas de casa de vegetação com 150 dias de idade, onde: DF = fator de diluição; PManto = peso molecular de betacianina (550 g/mol); V = volume da solução extratora (ml); m = massa fresca (g); ϵ = coeficiente de extinção molar de betacianina (65.000 L mol⁻¹ cm⁻¹); L = comprimento da cubeta (1 cm).

O método empregado para testes de média foi a análise de variância (P <0,05) dos modelos de regressão linear e quadrática para concentrações de ácido húmico e fúlvico em laboratório e em casa de vegetação, utilizando o software RStudio (2012). Os gráficos

apresentados são suavizações de regressão local (LOWESS -Locally Weighted Scatterplot Smoothing).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando avaliadas *in vitro*, verificaram-se diferença significativa para as variáveis fitotécnicas: número de brotos e diâmetro, comprimento raiz principal e matéria fresca e seca de parte aérea (Tabela 4).

TABELA 4 – Resumo da análise de variância (Anova) para log do: Teor de clorofila a (CA), clorofila b (CB), carotenoides (CAR) e clorofila total (CT) e betacianina (BETA) (mg/g de MS). Espessura da epiderme (EPI), do xilema (XI), córtex (COR), floema (FLO), medula (MED) e área total (AT) das raízes. Número de raízes (NR) comprimento de raiz (CR) (cm), número de brotos (NB), comprimento de brotos (CB) (cm), diâmetro de brotos (DB) (cm), matéria fresca (MF) (mg), matéria seca (MS) (mg), aos 45 dias de cultivo *in vitro*. Comprimento de brotos (CB CV) (cm), número de brotos (NB CV), diâmetro de brotos (DB CV) (cm), número de raízes (NR), comprimento de raiz (CR) (cm) aos 150 dias em casa de vegetação.

Variáveis em estudo	Fontes de variação			
	Fontes	Doses	Dose ²	Fonte: Dose
CL A	2,6961	1,1130	0,0011	1,7004
CL B	0,4601	0,0974	0,0737	0,9763
CARO	2,2460	4,5757	1,4675	4,5115
CL T	1,1414	0,4151	0,0968	1,2899
EPI	0,4618	0,0275	0,1412	8,1149*
XI	3,0453	1,6206	9,8425*	0,1602
COR	3,0977	1,5666	2,6961	0,0416
FLO	5,4632	1,1438	11,1678*	1,7172
MED	0,2175	0,0252	2,8947	0,3278
AT	2,9087	5,8730	5,4725	0,003
BETA	1,5362	0,4130	0,9295	0,1861
CB	0,2041	0,1904	1,0523	0,2516
NB	0,8984	1,8473	8,8479*	0,0127
DB	0,9550*	10,0845*	0,4885	0,0010
NR	0,1025	0,0070	0,2625	0,0636
CR	2,6738	6,4639	10,6894*	0,1010
MF	2,4187	10,6649*	5,4939	0,3837
MS	4,9286	11,56796**	8,7001	0,2654
NB	0,2934	8,1362*	0,0499	9,1580*
CB	5,1483	8,7550*	0,7398	4,0472

Variáveis em estudo	Fontes de variação			
	Fontes	Doses	Dose ²	Fonte: Dose
DB	8,2697*	2,0441	0,0001	2,9917
CR	0,2724	8,3524*	0,7226	0,5709
NR	2,8960	6,9056	0,7781	2,8016

*Significativo na análise sequencial a 5% de probabilidade pelo teste F.

**Significativo na análise sequencial a 1% de probabilidade pelo teste F.

Fonte: Da autora (2020).

Na análise sequencial dos caracteres com diferença significativa foi realizado o teste t para indicar o aumento ou diminuição das fontes ácido húmico e fúlvico e suas concentrações e interações (Tabela 5).

Tabela 5 – Estimativa do teste t para comparação entre médias de tratamentos para: espessura da epiderme (EPI), do xilema (XI), floema (FLO), das raízes, comprimento de raiz (CR) (cm), número de brotos (NB), comprimento de brotos (CB) (cm), diâmetro de brotos (DB) (cm), matéria fresca (MF) (mg), matéria seca (MS) (mg), aos 45 dias de cultivo *in vitro*. Comprimento de brotos (CB CV) (cm), número de brotos (NB CV), diâmetro de brotos (DB CV) (cm), comprimento de raiz (CR) (cm) aos 150 dias em casa de vegetação.

Variáveis em estudo	Fontes de variação			
	Fontes	Doses	Dose ²	Fonte: Dose
EPI	-0,707	1,710	-0,523	-2,269
XI	-3,235*	3,381*	-4,160**	-1,661
FLO	-3,648**	2,956*	-4,345**	-1,059
NB	0,149	2,520	-2,532	-0,498
DB	4,701	2,048	-1,309	-0,445
CR	-0,041	0,0884	-3,267*	-0,731
MF	1,104	3,186*	-1,533	-0,540
MS	0,780	-0,096	-2,627	-0,179
NB CV	-0,983	0,612	-0,741	-2,72*
CB CV	-3,225*	0,256	-1,030	-3,061*
DB CV	-4,130**	1,652	-2,122	-3,338*
CR CV	-0,365	-0,954	-1,223	-0,90

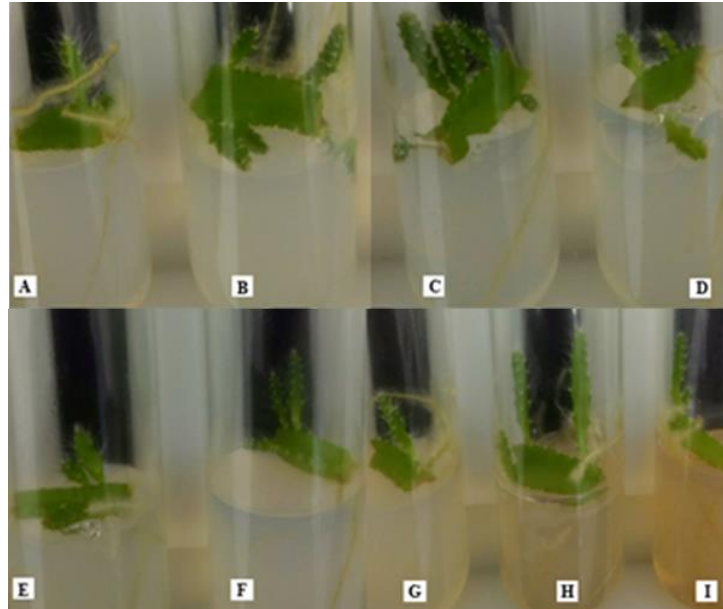
*Significativo a 5% de probabilidade pelo teste T.

**Significativo a 1% de probabilidade pelo teste T.

Fonte: Da autora (2020).

Visualmente a testemunha teve menor crescimento que os demais tratamentos (Figura 11).

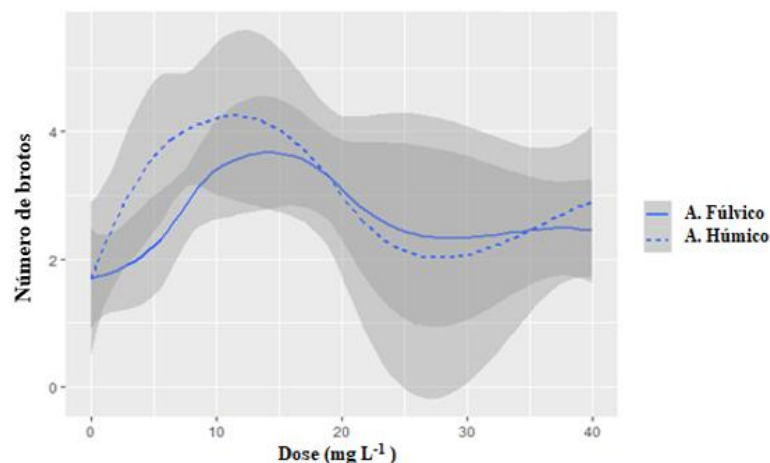
Figura 11 - Plântulas de pitaia (*Hylocereus polyrhizus*) aos 45 dias de cultivo, submetidas a diferentes concentrações de ácido húmico e fúlvico. A: testemunha, B: 5 mg L⁻¹, C: 10 mg L⁻¹, D: 20 mg L⁻¹, E: 40 mg L⁻¹, F: 5 mg L⁻¹, G: 10 mg L⁻¹, H: 20 mg L⁻¹, I: 40 mg L⁻¹.



Fonte: Da autora (2020).

Considerando número de brotos ($p=0,0037$), a dose de 10 mg L⁻¹ dos ácidos, foram bastante eficientes gerando maiores quantidades de brotações (Figura 12).

Figura 12 - Número de brotos de pitaia (*Hylocereus polyrhizus*) submetidas a diferentes concentrações *in vitro* de ácido húmico e fúlvico 0, 5, 10, 20 e 40 mg L⁻¹.



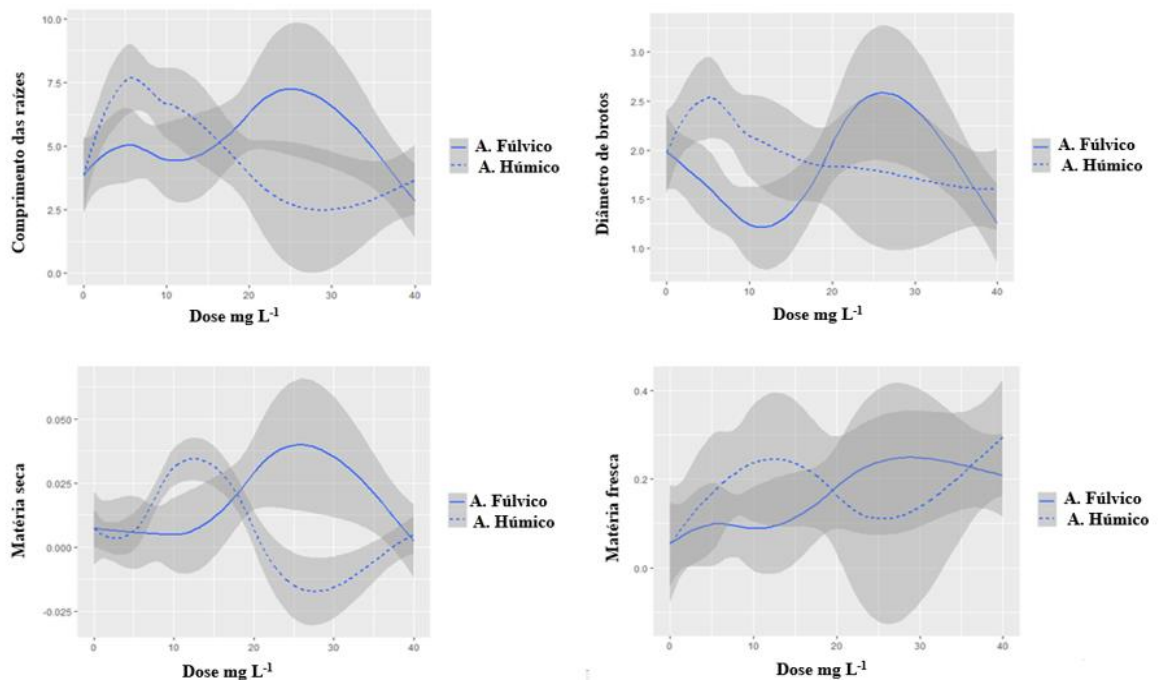
Fonte: Da autora (2020).

Quando considerado o comprimento das raízes ($p=0,0015$) a dose 5 mg L⁻¹ de ácido húmico também foi a mais efetiva promovendo maiores raízes *in vitro* (Figura 13). Ressalta-se que houve diferença estatística apenas entre doses. Ainda na mesma figura

podemos observar o diâmetro dos brotos ($p= 0,0020$), onde maiores valores foram observados também na concentração 5 mg L^{-1} de ácido húmico, porém não houve diferença para a interação entre as fontes e doses de substâncias húmicas.

Em relação a matéria fresca da parte aérea das plantas de pitaia ($p= 0,0019$), maiores doses como a de 40 mg L^{-1} promovem maiores acúmulos (Figura 13). Já para matéria seca da parte aérea ($p= 0,0041$), podemos observar pela mesma figura que menores doses com 10 mg L^{-1} no caso de ácido húmico como 20 mg L^{-1} de ácido fúlvico resultaram maiores pesos e ressalta-se que não houve diferença significativa entre as fontes de substâncias húmicas.

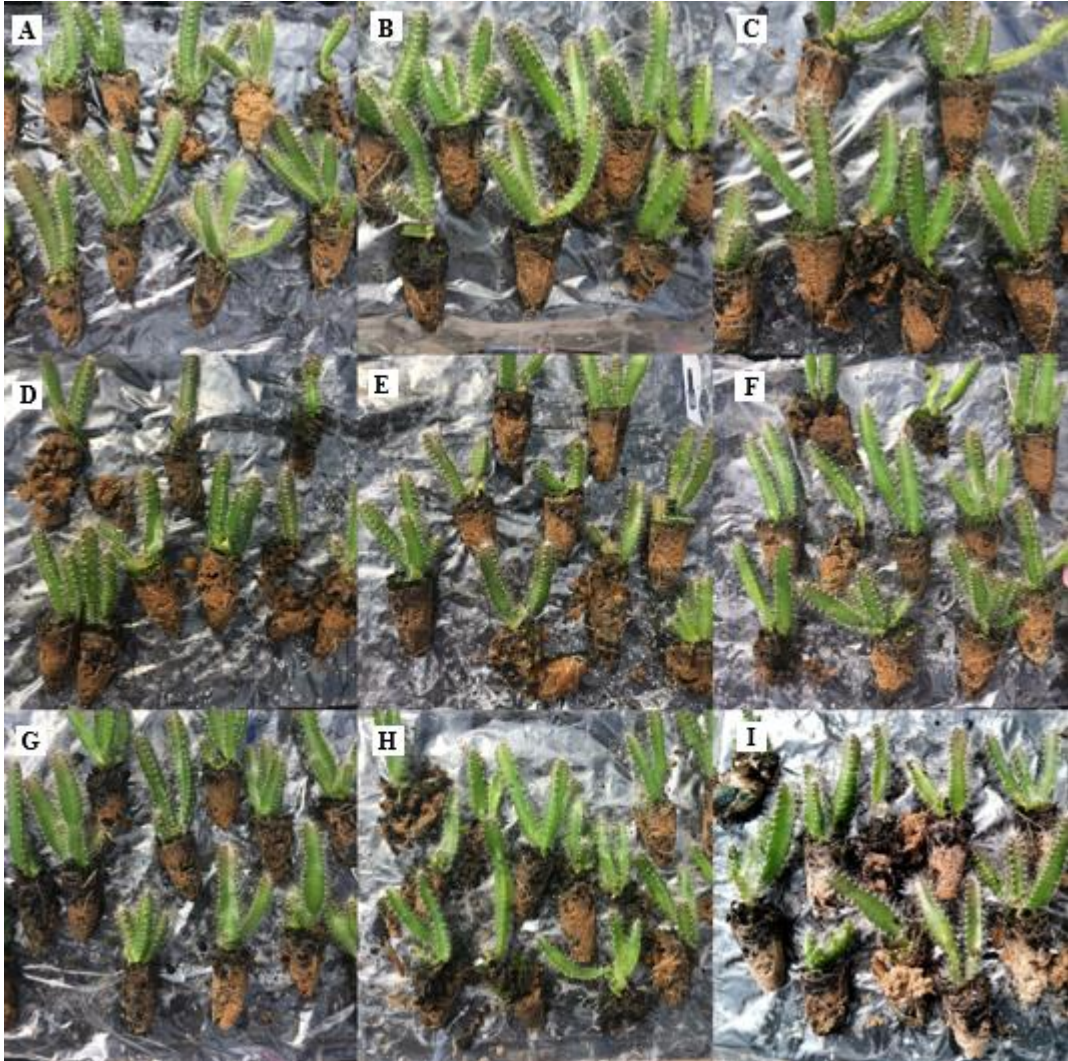
Figura 13 - Comprimento das raízes, diâmetro de brotos, matéria seca e matéria fresca de pitaia (*Hylocereus polyrhizus*) submetidas a diferentes concentrações *in vitro* de ácido húmico e fúlvico 0, 5, 10, 20 e 40 mg L^{-1} .



Fonte: Da autora (2020).

Após 150 dias em casa de vegetação as plantas que receberam as substâncias húmicas já estavam bem desenvolvidas e com bastante brotos (Figura 14).

Figura 14 - Plantas de pitaia (*Hylocereus polyrhizus*) aclimatizadas após 150 dias de cultivo, submetidas a diferentes concentrações de ácido húmico e fúlvico. A: testemunha, B: 5 mg L⁻¹, C: 10 mg L⁻¹, D: 20 mg L⁻¹, E: 40 mg L⁻¹, F: 5 mg L⁻¹, G: 10 mg L⁻¹, H: 20 mg L⁻¹, I: 40 mg L⁻¹.



Fonte: Da autora (2020).

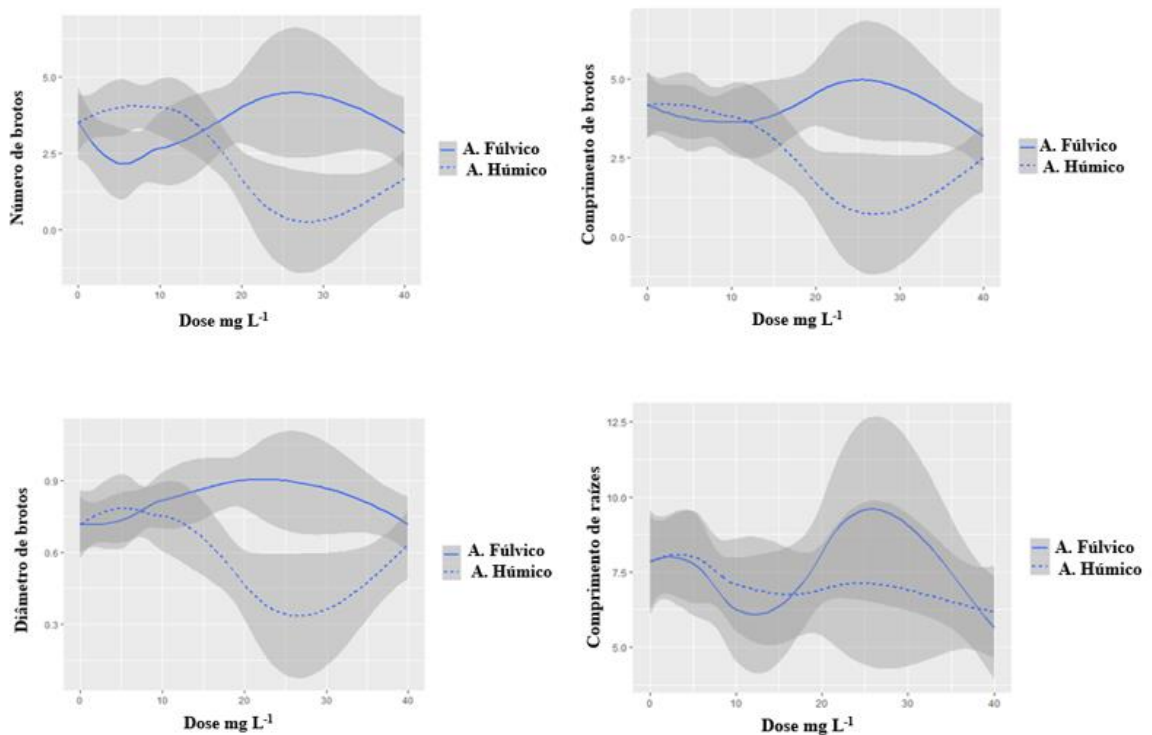
Após 150 de aclimatização das plantas os maiores números de brotos ($p=0,0087$), foram obtidos nas concentrações 5 e 10 mg L⁻¹ de ácido húmico, concentrações que foram superiores as demais, mais que não se difereriram estatisticamente (Figura 15).

Nessa mesma figura podemos observar que quando considerado o comprimento dos brotos de pitaia ($p=0,0034$) essas menores concentrações de ácidos húmicos como 5 mg L⁻¹ demonstraram melhores valores enquanto que para o ácido fúlvico valores medianos como 20 mg L⁻¹ foram bastante eficientes nesse quisito.

Ainda podemos observar que considerando o diâmetro dos brotos ($p=0,0015$) o tratamento contendo 20 mg L⁻¹ de ácido fúlvico foi o que gerou valores superiores (Figura

15) e para as raízes, maiores valores de comprimento ($p=0,0055$), corresponderam também a dose 20 mg L^{-1} de ácido fúlvico como a dose 5 mg L^{-1} de ácido húmico, porém não houve diferença significativa entre as fontes de substâncias húmicas.

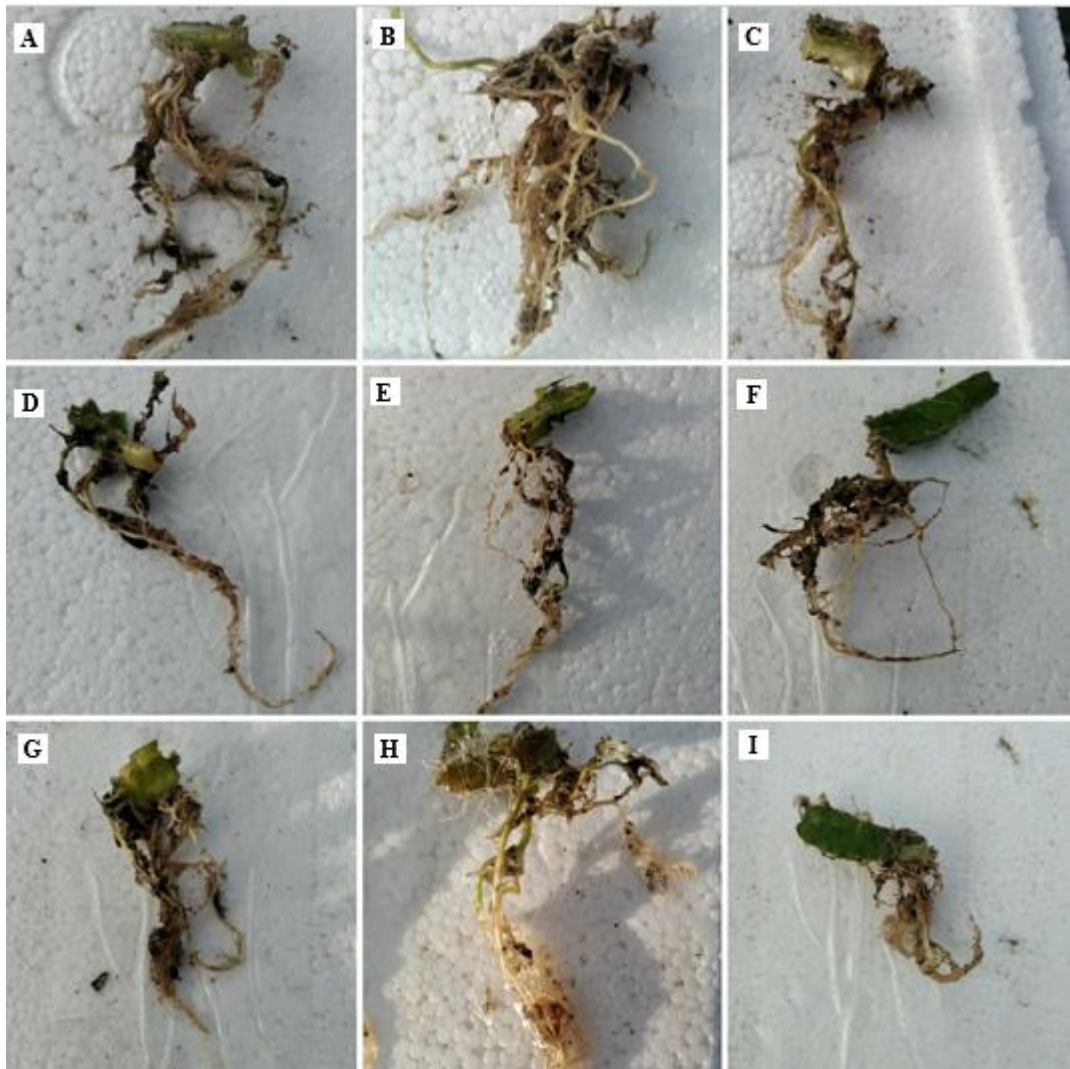
Figura 15 - Número de brotos de pitaia (*Hylocereus polyrhizus*) aclimatizadas após 150 dias de cultivo, submetidas a diferentes concentrações de ácido húmico e fúlvico. A: testemunha, B: 5 mg L^{-1} , C: 10 mg L^{-1} , D: 20 mg L^{-1} , E: 40 mg L^{-1} , F: 5 mg L^{-1} , G: 10 mg L^{-1} , H: 20 mg L^{-1} , I: 40 mg L^{-1} .



Fonte: Da autora (2020).

Aos 150 dias quando as raízes foram coletadas para a continuação das análises as mesmas apresentavam-se vigorosas visualmente e a dose 5 mg L^{-1} promoveu bastante raízes secundárias (Figura 16).

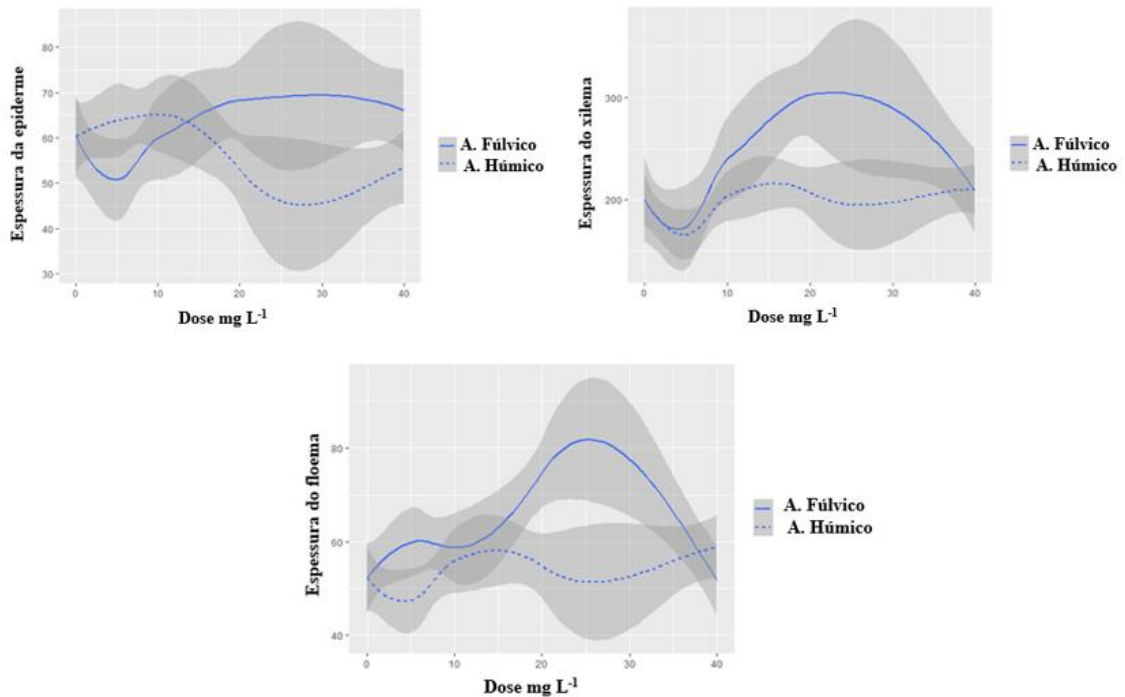
Figura 16 - Raízes de pitaiá (*Hylocereus polyrhizus*) aos 150 dias de cultivo, submetidas a diferentes concentrações de ácido húmico e fúlvico. A: testemunha, B: 5 mg L⁻¹, C: 10 mg L⁻¹, D: 20 mg L⁻¹, E: 40 mg L⁻¹, F: 5 mg L⁻¹, G: 10 mg L⁻¹, H: 20 mg L⁻¹, I: 40 mg L⁻¹.



Fonte: Da autora (2020).

Considerando a análise anatômica das raízes houve diferença significativa para as variáveis espessura da epiderme da raiz ($p = 0,0055$), espessura do xilema ($p = 7,65e-05$) e floema ($p = 3,88e-05$) para todas elas as plantas que receberam 20 mg L⁻¹ de ácido fúlvico obtiveram maiores valores (Figura 17).

Figura 17 - Espessura da epiderme, do xilema e do floema das raízes de pitaia (*Hylocereus polyrhizus*) aos 150 dias de cultivo, submetidas a diferentes concentrações de ácido húmico e fúlvico. A: testemunha, B: 5 mg L⁻¹, C: 10 mg L⁻¹, D: 20 mg L⁻¹, E: 40 mg L⁻¹, F: 5 mg L⁻¹, G: 10 mg L⁻¹, H: 20 mg L⁻¹, I: 40 mg L⁻¹.

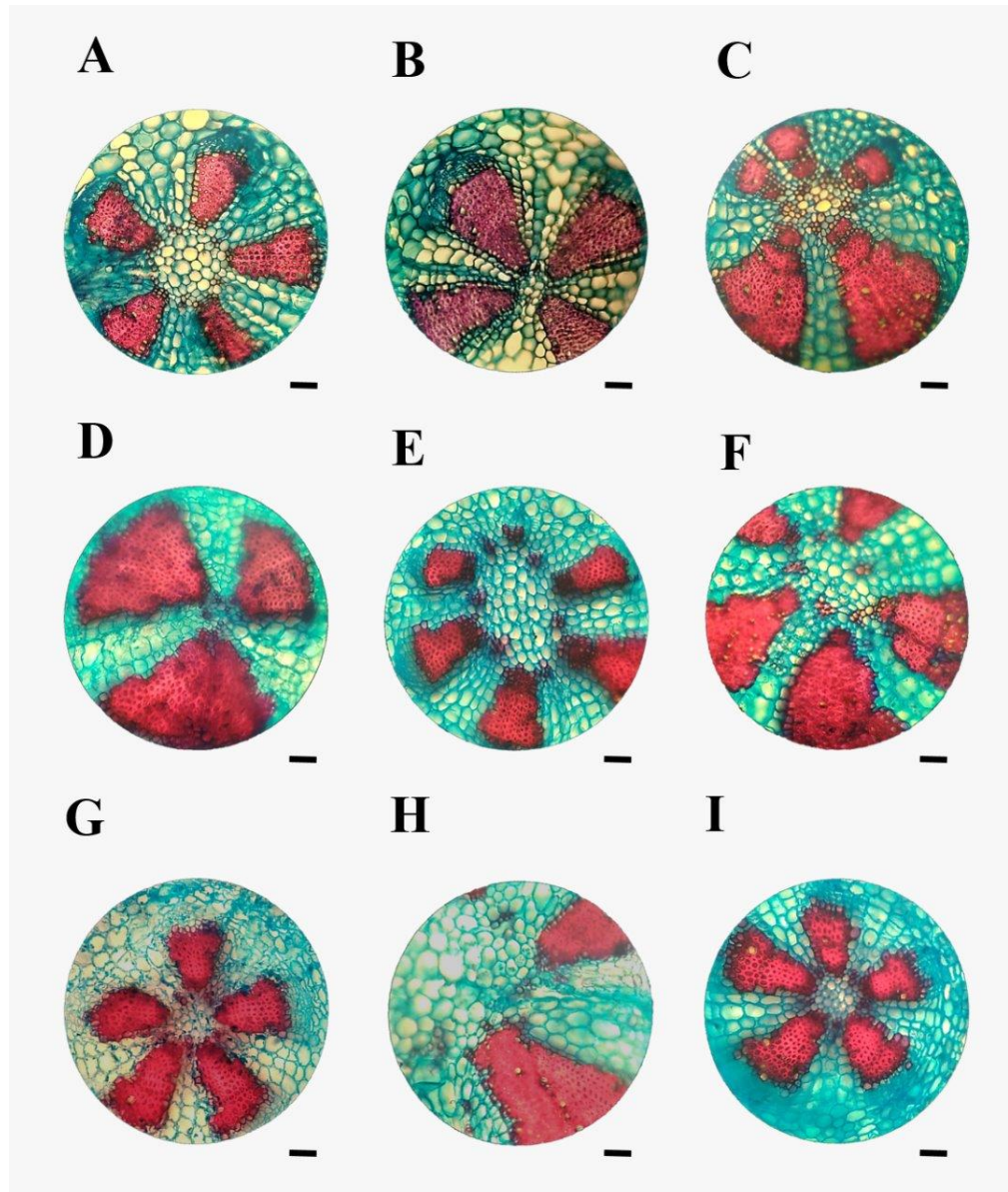


Fonte: Da autora (2020).

As imagens anatômicas demonstraram detalhes da região central dos cortes realizados, dando destaque a variabilidade de arranjos e formas das células submetidas as diferentes fonte de substâncias húmicas e suas concentrações.

Foi possível notar que as células das plantas que receberam 20 mg L⁻¹ de ácido fúlvico eram bem discrepantes das demais, tendo maior tamanho e assim dificuldade de serem encaixadas no foco do aumento (Figura 18). Essas raízes foram comprovadamente mais grossas e maiores.

Figura 18 - Cortes anatômicos transversais de raízes de plantas de pitaia (*Hylocereus polyrhizus*) aos 150 de cultivo após aclimatização, submetidas a diferentes concentrações de ácido húmico e fúlvico. A: testemunha, B: 5 mg L⁻¹, C: 10 mg L⁻¹, D: 20 mg L⁻¹, E: 40 mg L⁻¹, F: 5 mg L⁻¹, G: 10 mg L⁻¹, H: 20 mg L⁻¹ células maiores, I: 40 mg L⁻¹. Aumento de 40x, a barra equivale a 50 µm.



Fonte: Da autora, (2020).

Quando considerando os pigmentos fotossintéticos, não houve diferença significativa entre nenhum deles.

Em relação aos resultados as pesquisas têm reportado que a aplicação de ácidos húmicos via radicular nas plantas aumenta o crescimento das raízes (GARCIA et al., 2012), o que corrobora com esse trabalho, visto que baixas concentrações como 5 mg L⁻¹

de ácido húmico e médias como 20 mg L⁻¹ de ácido fúlvico auxiliam no enraizamento e na estrutura anatômica de plantas de pitaiá, e conseqüentemente no seu desenvolvimento.

As substâncias húmicas são capazes de estimular o crescimento radicular, devido a ação do tipo hormonal natural que induzem a proliferação das raízes secundárias (CANELLAS et al., 2002). Segundo Rose et al. (2014), essas substâncias promovem o crescimento das plantas por meio de bioestimulação e o crescimento radicular ocorre também por meio da ativação e expressão das H⁺ATPases, e pelo maior transporte (influxo e efluxo) de íons (ZANDONADI et al., 2013; RAMOS et al., 2015).

Dessa forma, o ácido húmico nas concentrações 1 e 2 mg L⁻¹ tem sido usado para enraizar plantas lenhosas como azaleia *in vitro* e melhorou o caráter morfológico das raízes comprimento, número e porcentagem comparado com outros tratamentos (ELMONGY et al., 2018).

Essa atividade potente de enraizamento ocorre, pois, as substâncias húmicas tem apresentando funções similares ao do fitormônio auxina (DOBBSS et al., 2010). Em certas espécies como em morangos a adição de substâncias húmicas foi mais benéfica que o uso de auxinas no desenvolvimento do sistema radicular (RZEPKA-PLEVNES et al., 2011) viabilizando essa substituição de componentes do meio.

Da Silva et al. (2015) observou que esses ácidos foram capazes de incrementar o crescimento das plantas e os definiu como bioestimulantes eficientes, visando a produção de mudas e essa função bioestimulante foi efetiva para as mudas de pitaiá.

Essas substâncias também têm impactos positivos sobre a aclimatização de frutíferas. Marino et al. (2009), trabalhando com pera *in vitro* com adição de 0,5 mg L⁻¹ de ácido húmico, observou bom desempenho no crescimento das plantas durante a aclimatização, com acréscimo em altura e peso da parte aérea. Bons resultados também foram observados em plantas de abacaxi micropropagadas por Baldotto et al. (2009) e em bananeira 'Grande Naine' por Nomura et al. (2012). Esses autores comentam que as substâncias húmicas favorecem o desenvolvimento das mudas aclimatizadas, deste modo estes trabalhos corroboram com os resultados em pitaiá.

Baldotto et al. (2009) ainda observou que substâncias húmicas não promoveram mudanças qualitativas e quantitativas na organização anatômica da lâmina foliar das plantas de abacaxi, que possuíam em todos os tratamentos folhas hipostomáticas, tricomas tectores e escamiformes. Neste trabalho não foi avaliado anatomicamente a parte aérea das plantas, visto que o maior efeito das substâncias húmicas ocorre sobre as raízes e daí a necessidade de avaliá-las.

Em ameixas micropropagadas, Wiszniewska et al. (2016) ressalta que há relação de alterações anatômicas radiculares com a presença de substâncias húmicas em plantas, o que ocorre numericamente com as estruturas avaliadas nesse trabalho. É bastante interessante observar que plantas com células desenvolvidas, bem estruturadas e de tamanho superior, com alta espessura de epiderme, xilema e floema como as encontradas nas raízes de pitáia na dose 20 mg L⁻¹ de ácido fúlvico podem auxiliar num maior desenvolvimento das plantas de pitáia futuramente, visto que quanto melhor for o sistema radicular das plantas melhor o seu desenvolvimento e melhor sua produção futura.

A maior espessura da epiderme pode funcionar com uma barreira a entrada de microorganismos patogênicos, aumentando a tolerância a estresses abióticos, assim como um aumento na espessura do floema e do xilema podem conseqüentemente facilitar o fluxo de carboidratos e água respectivamente nos tecidos (PEREIRA et al., 2008).

Percebe-se, contudo que o ácido fúlvico possivelmente teve destaque para os caracteres anatômicos devido a sua menor massa molar (618 g mol⁻¹), maior solubilidade em qualquer valor de pH e maior carga polar (DOBBSS et al., 2009).

Quanto a alterações de pigmentos fotossintéticos causadas por substâncias húmicas, Baldotto et al. (2009) após o tratamento de plantas de abacaxi (*Ananas comosus* L.) com ácidos húmicos comentam que os pigmentos: clorofila *a*, clorofila *b* e carotenoides, em média, pouco variaram entre os tratamentos não apresentando contrastes significativos como nesse trabalho.

4 CONCLUSÕES

Melhores desempenhos de mudas de pitaia foram encontradas em plantas submetidas a concentração 20 mg L^{-1} de ácido fúlvico e aclimatizadas após 150 dias, com um destaque para suas características de enraizamento e variáveis anatômicas, demonstrando o potencial do tratamento ao estímulo do crescimento.

REFERÊNCIAS

- BALDOTTO, L. E. B., et al. Desempenho do abacaxizeiro 'vitória' em resposta à aplicação de ácidos húmicos durante a aclimatação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 979-990, 2009.
- CAI, Y. et al. Characterization and quantification of betacyanin pigments from diverse *Amaranthus* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, n.6, p.2063-2070, 1998.
- CANELLAS, L.P., et al., Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. **Plant Physiology**, v. 130, p. 1951-1957, 2002.
- CANELLAS. L. P. et al. Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 15-27, 2015.
- CHEN, C. et al. Identification of reliable reference genes for quantitative real-time PCR normalization in pitaya. **Plant methods**, v. 15, n. 1, p. 70, 2019.
- CID, L. P. B., TEIXEIRA, J. B. (2014). Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: Cid, L. P. B. (ed.). **Cultivo *in vitro* de plantas**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Cult. 125, 163-176.
- DA SILVA, M. A. C. et al. Ácidos húmicos de vermicomposto estimulam o crescimento *in vitro* de plântulas de *Cattleya warneri* (Orchidaceae). **Rodriguésia**, v. 66, p. 759-768, 2015.
- DOBBSS, L. B. et al. Caracterização química e espectroscópica de ácidos húmicos e fúlvicos isolados da camada superficial de Latossolos brasileiros. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 1, p. 51-63, 2009.
- DOBBSS, L.B. et al. Bioactivity of chemically transformed humic matter from vermicompost on plant root growth. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 58, p. 3681-3688, 2010.
- ELMONGY, M. S. et al. The effect of humic acid on endogenous hormone levels and antioxidant enzyme activity during *in vitro* rooting of evergreen azalea. **Scientia horticulturae**, v. 227, p. 234-243, 2018.
- GARCIA, A. C.; et al. Vermicompost humic acids as an ecological pathway to protect rice plant against oxidative stress. **Ecological Engineering**, v. 47, p. 203-208, 2012.
- KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: UFRRJ, 1997. p. 198.
- LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. **Current protocols in food analytical chemistry**, v. 1, n. 1, p. F4. 3.1-F4. 3.8, 2001.

LOPES, C. A. et al. Indução de calos, potencial embriogênico e estabilidade genética em pitaia vermelha. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 11, n. 1, p. 21-25, 2016.

MARINO, G. et al. *In vitro* treatment with a low molecular weight humic acid can improve growth and mineral uptake of pear plantlets during acclimatization. In: **XI International Symposium on Plant Bioregulators in Fruit Production**, v. 884, p. 565-572, 2009.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NOMURA, E. S. et al. Aclimatização de mudas micropropagadas de bananeira 'Grand Naine' com aplicação de biofertilizantes em duas estações do ano. **Revista Ceres**, v. 59, p. 518-529, 2012.

OLIVEIRA, L. S.; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, n. 76, p. 439-453, 2013.

ORTIZ-HERNÁNDEZ, Y. D.; CARRILLO-SALAZAR, J. A. Pitahaya (*Hylocereus* spp.): A short review. **Comunicata Scientiae**, v. 3, n. 4, p. 220-237, 2012.

PEREIRA, F. J. et al. Evolução da anatomia radicular do milho 'Saracura' em ciclos de seleção sucessivos. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 43, n. 12, p. 1649-1656, 2008.

RAMOS, A.C. et al. Humic matter elicits proton and calcium fluxes and signaling dependent on Ca²⁺-dependent protein kinase (CDPK) at early stages of lateral plant root development. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 2, p. 1-12, 2015.

ROSE, M. T., et al. A meta-analysis and review of plant-growth response to humic substances: practical implications for agriculture. **Advances in Agronomy**, v. 124, p. 37-89, 2014.

RZEPKA-PLEVNES, D. et al. Effects of auxins and humic acids on *in vitro* rooting of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 9, p. 592-595, 2011.

SILVA, M. M. A.; FERREIRA, L. T. Cultivo *in vitro* de plantas e suas aplicações em cactáceas. Campina Grande: **INSA**, 2016.

STUDIO, R. R. Studio: integrated development environment for R. **RStudio Inc, Boston, Massachusetts**, 2012.

SWIFT R.S. Caracterização da matéria orgânica . In: Sparks DL , editor. Métodos de análise do solo. **Sociedade de Ciência do Solo da América** ; p. 1018-1020, 1996

WISZNIEWSKA. A.; et al. Rooting response of *Prunus domestica* L. microshoots in the presence of phytoactive medium supplements. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 125, n. 1, p. 163-176, 2016.

ZANDONADI, D.B. et al. Plant physiology as affected by humified organic matter. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 25, p. 12-25, 2013.