

ROBERTA CAROLINA FERREIRA GALVÃO DE HOLANDA

**TRATAMENTO DE SOJA COM SELÊNIO E AS RESPOSTAS
FISIOLÓGICAS E MORFO-ANATÔMICAS, SOB DÉFICIT HÍDRICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2018

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

H722t
2018
Holanda, Roberta Carolina Ferreira Galvão de, 1985-
Tratamento de soja com selênio e as respostas fisiológicas e
morfo-anatômicas, sob déficit hídrico / Roberta Carolina Ferreira
Galvão de Holanda. – Viçosa, MG, 2018.
viii, 72 p. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Cleberson Ribeiro.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Soja - Crescimento - Efeito do selênio. 2. Fluorescência.
3. Polietilenoglicol. 4. Antioxidantes. 5. Troca gasosa em
plantas. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia
Vegetal. II. Título.

CDD 22. ed. 633.34899

ROBERTA CAROLINA FERREIRA GALVÃO DE HOLANDA

**TRATAMENTO DE SOJA COM SELÊNIO E AS RESPOSTAS
FISIOLÓGICAS E MORFO-ANATÔMICAS, SOB DÉFICIT HÍDRICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 19 de fevereiro de 2018.



Eduardo Euclides de Lima e Borges



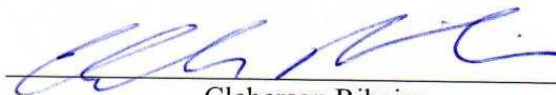
Leandro Elias Morais



Wagner Luiz Araújo



Juraci Alves de Oliveira
(Coorientador)



Cleberson Ribeiro
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de Rondônia, por ter me concedido a oportunidade de cursar doutorado em tempo integral na cidade de Viçosa/MG, por meio de edital de afastamento para cursar pós-graduação.

Ao professor Cleberson Ribeiro e aos professores Juraci Alves de Oliveira, Edgard Augusto de Toledo Picoli e Dimas Mendes Ribeiro, pelas orientações durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos professores Samuel Martins, Wagner Araújo, Leandro Morais, Eduardo Borges e a Genaina Souza, por terem participado do meu processo de qualificação e/ou defesa.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal e ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO) pelo acolhimento, estrutura, apoio e oportunidade para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Laboratório de Anatomia Vegetal (UFV) e ao Núcleo de Microscopia e Microanálise (UFV) pelo apoio durante a realização das atividades.

Ao Laboratório de Biogeoquímica Ambiental (UNIR/RO), na pessoa do professor Wanderley R. Bastos, pelo auxílio na quantificação de selênio.

Aos professores Lino Roberto e Francisco Cláudio (UFV), pelas explicações e sugestões quanto à técnica de pulverização, e ao Rafael pelo auxílio na pulverização e nas elucidações sobre a técnica, após a aplicação.

Aos colegas de laboratório e de curso, pelo companheirismo e vivências.

Às pessoas que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

À toda a minha família, por sempre estarem ao meu lado.

Muito obrigada.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Roberta Carolina Ferreira Galvão de Holanda é Licenciada e Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Rondônia (UNIR) (2004-2007) e mestre em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente pela mesma instituição (2008-2010). Desde 2013 é professora no Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de Rondônia, *Campus* Colorado do Oeste.

SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS.....	3
CAPÍTULO 1	
SELÊNIO COMO PROMOTOR DE MODIFICAÇÕES	
MORFOLÓGICAS, FISIOLÓGICAS E ANATÔMICAS EM SOJA	
	7
Resumo.....	7
Abstract.....	8
1.1 Introdução.....	8
1.2 Material e Métodos.....	10
1.3 Resultados.....	15
1.4 Discussão.....	34
1.5 Conclusões.....	37
1.6 Referências.....	37
CAPÍTULO 2	
EFEITOS DO TRATAMENTO COM SELENATO DE SÓDIO E	
POLIETILENOGLICOL EM PLANTAS DE SOJA	
	42
Resumo.....	42
Abstract.....	43
2.1 Introdução.....	43
2.2 Material e Métodos.....	46
2.3 Resultados.....	52
2.4 Discussão.....	63
2.5 Conclusões.....	66
2. 6 Referências.....	67
CONCLUSÕES GERAIS.....	72

RESUMO

HOLANDA, Roberta Carolina Ferreira Galvão de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2018. **Tratamento de soja com selênio e as respostas fisiológicas e morfo-anatômicas, sob déficit hídrico.** Orientador: Cleberson Ribeiro. Coorientadores: Dimas Mendes Ribeiro, Edgard Augusto de Toledo Picoli e Juraci Alves de Oliveira.

Condições ambientais adversas têm prejudicado o crescimento e o desenvolvimento de plantas de soja (*Glycine max* L.). Diante disso, várias pesquisas vêm sendo realizadas, a fim de minimizar os efeitos dos diferentes estresses abióticos sobre essa cultura. Dentre elas, merecem destaque as que envolvem a aplicação de selênio (Se), um elemento químico benéfico por induzir respostas morfológicas, fisiológicas e metabólicas favoráveis ao desenvolvimento de diferentes espécies agrícolas, sob condições ambientais adversas. Nesse sentido, poucas pesquisas retratam os efeitos do Se em soja, existindo, assim, uma grande lacuna a respeito de qual (is) concentração (ões) e modo (s) de aplicação de Se que pode (m) favorecer, possíveis, respostas de defesa das plantas ao estresse. Nesse sentido, fez-se necessário, primeiramente, investigar os efeitos do fornecimento de Se, aplicado na forma de selenato de sódio a 5, 10, 20, 30, 40 e 80 μM via pulverização, solução nutritiva e *priming*, em plantas de soja do cultivar EMBRAPA 48 no estágio vegetativo, sob condições de plena hidratação. Posteriormente, a concentração e o modo de fornecimento de Se, identificados como indutores das respostas mais favoráveis ao crescimento e ao desenvolvimento das plantas, foram aplicadas antes de induzi-las ao déficit hídrico, por meio do fornecimento de polietilenoglicol (PEG 6000). Para as duas condições experimentais, as plantas foram cultivadas em solução nutritiva de Clark, sob aeração constante e em câmara de crescimento de plantas, em condições de temperatura, luminosidade e umidade controladas. Foram realizadas avaliações do crescimento, trocas gasosas e de fluorescência da clorofila *a*, além de avaliações anatômicas e bioquímicas, em busca de diferentes efeitos do fornecimento de Se às plantas. Os resultados indicaram que as respostas das plantas estiveram em função do acúmulo de Se em seus tecidos. Nesse sentido, identificou-se a pulverização com 80 μM como o modo e a concentração de Se ideais, por terem incrementado a *An*, o *qP*, o *Y(II)* e a *ETR* das plantas, dessa forma, representando potenciais indutores de

respostas de proteção ou evitação, ao estresse por déficit hídrico. Assim, as respostas das plantas sob déficit hídrico, previamente pulverizadas com 80 μM de Se, indicaram que o cultivar EMBRAPA 48 recorreu ao efeito antioxidante do Se, para atenuar alguns dos principais sintomas do déficit hídrico. Os mecanismos envolvidos nessa resposta compreenderam, principalmente, modificações anatômicas na espessura da epiderme adaxial, do parênquima esponjoso e na área da secção transversal total da raiz, além de alterações nos teores de espécies reativas de oxigênio. Diante da inexpressiva atividade das principais enzimas do sistema antioxidativo, mesmo havendo o acúmulo de espécies reativas, e da ausência de acúmulo de prolina e aminoácidos solúveis, não foi possível esclarecer os mecanismos bioquímicos envolvidos nas respostas de evitação ao déficit hídrico. Nesse sentido, há indícios de que o tempo de exposição das plantas ao déficit hídrico tenha sido excessivo, suprimindo, assim, seu sistema antioxidativo enzimático.

ABSTRACT

HOLANDA, Roberta Carolina Ferreira Galvão de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2018. **Treatment of soybean with selenium and the physiological and morpho-anatomical responses, under water deficit.** Adviser: Cleberson Ribeiro. Co-advisers: Dimas Mendes Ribeiro, Edgard Augusto de Toledo Picoli and Juraci Alves de Oliveira.

Adverse environmental conditions have impaired the growth and development of soybean plants (*Glycine max* L.). Therefore, several researches have been carried out in order to minimize the effects of different abiotic stresses on this culture. Among them, deserve special mention the use of selenium (Se), a beneficial chemical element for inducing morphological, physiological and metabolic responses favorable to the development of different agricultural species, under adverse environmental conditions. In this sense, few researches portray the effects of Se on soybean, thus, there is a large gap regarding which concentration (s) and mode (s) of application of Se that can favor possible responses from plant defense to stress. In this sense, it was first necessary to investigate the effects of the Se supply, applied as sodium selenate at 5, 10, 20, 30, 40 and 80 μM via spraying, nutrient solution and *priming*, in soybean plants, EMBRAPA 48 grow crop, at the vegetative stage, under conditions of full hydration. Later, the concentration and mode of supply of Se, identified as inducers of the most favorable responses to the growth and development of the plants, were applied before inducing them to the water deficit, through the supply of polyethylene glycol (PEG 6000). For the two experimental conditions, the plants were grown in nutrient solution of Clark, under constant aeration and in a chamber of growth of plants, under conditions of controlled temperature, luminosity and humidity. It was realized growth assessments, gas exchange and fluorescence of chlorophyll *a*, as well as anatomical and biochemical evaluations, were carried out in search of different effects of the supply of Se to the plants. The results indicated that the responses of the plants were due to the accumulation of Se in their tissues. In this sense, the 80 μM spray was identified as the mode and concentration of Se, for having increased the *Pn*, the *qP*, the *Y(II)* and the *ETR* of the plants, thus, representing potential inducers of protection or avoidance, to stress due to water deficit. Thus, the responses of plants under water deficit, previously sprayed with 80

μM of the Se, indicated that the EMBRAPA 48 grow crop resorted to the antioxidant effect of Se to attenuate some of the main symptoms of water deficit. The mechanisms involved in this response mainly comprised anatomical changes in the thickness of the upper epidermis, the spongy parenchyma and in the total cross-sectional area of the root, as well as alterations in the contents of reactive oxygen species. In view of the inexpressive activity of the main enzymes of the antioxidative system, despite the accumulation of reactive species and the absence of accumulation of proline and soluble amino acids, it was not possible to clarify the biochemical mechanisms involved in the avoidance responses to water deficit. In this sense, there is evidence that the time of exposure of the plants to the water deficit has been excessive, thus suppressing their enzymatic antioxidative system.

INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente, a soja [*Glycine max* L.) Merrill] é a principal cultura agrícola em extensão de área e produção no Brasil (CONAB, 2018). No entanto, apesar da elevada estimativa de produção, a redução na produtividade da soja (CONAB, 2016; 2017; 2018) tem preocupado os produtores e instigado pesquisas, no intuito de encontrar alternativas que minimizem as perdas de produtividade resultantes de condições adversas, como ataque de insetos (Seiter et al., 2013), concentrações de ozônio (McGrath et al., 2015), aquecimento (Zhang et al., 2016) e déficit hídrico (Dias et al., 2016; Silva et al., 2018). Nesse contexto, as pesquisas com selênio (Se), um elemento químico reconhecido como benéfico, podem ser favoráveis por desencadear alterações fisiológicas e/ou bioquímicas que podem incrementar o crescimento e a produtividade das plantas, tanto em condições ótimas de desenvolvimento (Boldrin et al., 2013; Pezzarossa et al., 2014; Zhang et al., 2014), quanto de estresse (Djanaguiramann et al., 2005; Germ et al., 2007; Nawaz et al., 2015; Kaur e Nayyar, 2015; Moulick et al., 2016; Nawaz et al., 2016a; Nawaz et al., 2016b; Mroczek-Zdyrska et al., 2017).

As pesquisas atribuem ao Se diferentes papéis, dentre eles, o de ser um antioxidante putativo (Pilon-Smits et al., 2009), um elemento químico essencial (Malavolta, 2006), um metaloide (Pommerrenig et al., 2015) ou um micronutriente (Pandey e Gupta, 2015). Dependendo do tempo de exposição, da espécie química de Se fornecida às plantas, da concentração e do método de aplicação, o Se, dentre vários processos, pode influenciar a germinação em *Triticum aestivum* (trigo) e *Oryza sativa* (arroz) (Nawaz et al., 2013; Hussain et al., 2016), o desenvolvimento de plântulas de soja (Zhang et al., 2003) e o crescimento de monocotiledôneas, como arroz (Hussain et al., 2016) e trigo (Iqbal et al., 2015; Mostofa et al., 2017). Seus efeitos têm origem, dentre outras fontes, da sua incorporação não específica a selenoaminoácidos e selenoproteínas (Terry et al., 2000).

Várias técnicas de fornecimento de Se podem induzir respostas nas plantas. Dentre elas, a pulverização se destaca por ser economicamente viável e fisiologicamente efetiva por garantir, tanto a pronta absorção foliar (Zieve e Peterson, 1984), quanto o acúmulo de Se (Nawaz et al., 2016b). Ela também é reconhecida por melhorar o rendimento e a qualidade da forragem do milho (Nawaz et al., 2016a), além de aumentar a produção de massa seca total (Djanaguiraman et

al., 2005). O fornecimento de Se via solução nutritiva, por sua vez, garante a sua pronta absorção através das raízes e a sua rápida translocação para a parte aérea das plantas (Hawrilak-Nowak et al., 2015), como resposta ao fluxo evapotranspiratório (Tinker, 1981). Tal fornecimento demonstra que a aplicação de baixos níveis de Se pode estimular o crescimento e o acúmulo de pigmentos fotossintéticos (Hawrilak-Nowak, 2009). Já o tratamento de sementes, conhecido como *priming*, por ser uma técnica controlada de hidratação de sementes, favorece a emergência e o vigor de plântulas de arroz e trigo. De forma geral, para essas três técnicas, o Se pode induzir tolerância a estresses (Jisha et al., 2013; Nawaz et al., 2013; Hussain et al., 2016).

Independente do modo de aplicação de Se, o seu fornecimento às plantas é uma forma eficaz de enriquecimento dos grãos (Hartikainen, 2005; Boldrin et al., 2013). Nesse sentido, a suplementação de espécies cultivadas com Se tem se destacado como forma eficaz e segura de suprir a necessidade desse nutriente, por populações residentes em áreas com solos carentes de Se, como a China (Chen et al., 2002) e a Finlândia (Hartikainen, 2005). No entanto, é necessário estar atento à dose de Se fornecida às plantas, pois ela deve combater o estresse oxidativo, em vez de causar oxidação nas plantas, conforme o observado por Hawrilak-Nowak et al., (2015) e Mostofa et al., (2017). Dessa forma, a técnica e a concentração de Se devem ser selecionadas com cautela para que a biofortificação não represente um risco à saúde humana.

Vários estudos apontam efeitos positivos, induzidos pelo tratamento com Se, em diferentes espécies vegetais. Cartes et al., (2005) atribuíram ao Se, a proteção de plantas de azevém contra o estresse oxidativo, por meio do aumento na atividade da enzima glutathione peroxidase. Boldrin et al., (2013) verificaram que a pulverização com Se eleva a produtividade em plantas de arroz. Nawaz et al., (2013) constataram que o *priming* com Se pode modular a germinação e o crescimento de plântulas de trigo, sob déficit hídrico. Tal fato foi corroborado por Hussain et al., (2016) em sementes de arroz sob estresse térmico e diferentes condições nutricionais. Ribeiro et al., (2016) relataram que o Se pode governar a alocação de carbono em plantas de *Arabidopsis thaliana*. No entanto, estudos indicam que o Se também pode causar toxicidade (Terry et al., 2000; Byrne et al., 2010; Mostofa et al., 2017), sendo que, o limite entre o seu nível benéfico e tóxico é estreito (Hawrilak-Nowak et al., 2015) e depende da espécie vegetal e do ambiente (Wiesner-Reinhold et al., 2017). Tal

toxicidade está relacionada ao fato do Se atuar como pro-oxidante (Hartikainen et al., 2000; Gupta e Gupta, 2017) e, ser capaz de, desencadear prejuízos às plantas.

Em soja cultivada em condições ambientais adversas, sabe-se que o Se pode atuar como um agente protetor antioxidativo (Djanaguiraman et al., 2005; Hu et al., 2014), aliviador dos efeitos da salinidade (Ardebili et al., 2014) e minimizador dos efeitos da radiação ultravioleta (Katharia e Baghel, 2016). Dentre as condições adversas, as quais a soja encontra-se susceptível ao longo do seu ciclo de vida, não há estudos que indiquem o modo de aplicação e/ou dose de Se que atenuem os efeitos do déficit hídrico. Nesse sentido, diante da importância econômica da soja e das evidências de que o Se pode beneficiá-la sob condições de estresse, o objetivo desta pesquisa foi, investigar respostas de plantas de soja previamente tratadas com Se, a duas condições de déficit hídrico, induzido pelo tratamento com polietilenoglicol 6000 (PEG 6000) via solução nutritiva. Para tanto, inicialmente definiu-se o modo de aplicação e a concentração de Se a serem aplicados, por serem os principais desencadeadores de respostas fisiológicas e morfo-anatômicas benéficas ao crescimento e ao desenvolvimento das plantas; para, finalmente, fornecê-los, previamente, à implementação do déficit hídrico.

REFERÊNCIAS

Ardebili NO, Saadatmand S, Niknam V, Khavari-Nejad RA (2014) The alleviating effects of selenium and salicylic acid in salinity exposed soybean. **Acta Physiol Plant** 36:3199-3205

Byrne SL, Durandean K, Nagy I, Barth S (2010) Identification of ABC transporters from *Lolium perenne* L. that are regulated by toxic levels of selenium. **Planta** 231:901-911

Boldrin PF, Faquin V, Ramos SJ, Boldrin KVF, Ávila FW, Guilherme LRG (2013) Soil and foliar application of selenium in rice biofortification. **J Food Compost Anal** 31:238-244

Cartes P, Gianfreda L, Mora ML (2005) Uptake of Selenium and its antioxidant activity in ryegrass when applied as selenate and selenite forms. **Plant Soil** 276:359-367

Chen L, Yang F, Xu J, Hu Y, Hu Q, Zhang Y (2002) Determination of selenium concentration of rice in China and effect of fertilisation of selenite and selenate on selenium content of rice. **J Agric Food Chem** 50:5128-5130

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. (2016) **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Brasília, DF. 179p

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. (2017) **Perspectivas para a agropecuária**. Brasília, DF. 112p

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. (2018) **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Brasília, DF. 126p

Dias LP, Oliveria-Busatto LA, Bodanese-Zanettini MH (2016) The differential expression of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] WRKY genes in response to water deficit. **Plant Physiol Biochem** 107:288-300

Djanaguiraman M, Devi DD, Shanker AK, Sheeba JÁ, Bangarusamy U (2005) Selenium – an antioxidative protectant in soybean during senescence. **Plant Soil** 272:77-86

Germ M, Kreft I, Stibilj V, Urbanc-Bercic O (2007) Combined effects of selenium and drought on photosynthesis and mitochondrial respiration in potato. **Plant Physiol Biochem** 45:162-167

Gupta M, Gupta S (2017) An overview of selenium uptake, metabolism, and toxicity in plants. **Front Plant Sci** 7:1-14

Hartikainen H, Xue T, Piironen V (2000) Selenium as an anti-oxidant and pro-oxidant in ryegrass. **Plant Soil** 225:193-200

Hartikainen H (2005) Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health. **J Trace Elem Med Bio** 18:309-318

Hawrilak-Nowak B (2009) Beneficial effects of exogenous selenium in cucumber seedlings subjected to salt stress. **Biol Trace Elem Res** 132:259-269

Hawrilak-Nowak B, Matraszek, Pogrzelec (2015) The dual effects of two inorganic selenium forms on the growth, selected physiological parameters and macronutrients accumulation in cucumber plants. **Acta Physiol Plant** 37:41

Hu J, Zhao Q, Cheng X, Selomutya C, Bai C, Zhu X, Li X, Xiong H (2014) Antioxidant activities of Se-SPI produced from soybean as accumulation and biotransformation reactor of natural selenium. **Food Chem** 146:531-537

Hussain S, Khan F, Cao W, Wu L, Geng M (2016) Seed priming alters the production and detoxification of reactive oxygen intermediates in rice seedlings grown under sub-optimal temperature and nutrient supply. **Front Plant Sci** 7:439

Iqbal M, Hussain I, Liaqat H, Ashraf MA, Rasheed R, Rehman AU (2015) Exogenously applied selenium reduces oxidative stress and induces heat tolerance in spring wheat. **Plant Physiol Biochem** 94:95-103

Jisha KC, Vijayakumari K, Puthur JT (2013). Seed priming for abiotic stress tolerance: an overview. **Acta Physiol Plant** 35:1381-1396

Katharia S, Baghel L (2016) Influence of UV exclusion and selenium on carbon fixation, nitrogen fixation and yield of soybean variety JS-335. **S Afr J Bot** 103:126-134

Kaur S, Nayyar, H (2015) Selenium fertilization to salt-stressed mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) plants reduces sodium uptake, improves reproductive function, pod set and seed yield. **Sci Hortic** 197:304-317

Malavolta E (2006) Manual de nutrição mineral de plantas. São Paulo: Agronômica Ceres 396-401p.

McGrath JM, Betzelberger AM, Wang Shaowen, Sook E, Zhu X-G, Long SP, Ainsworth A (2015) An analysis of ozone damage to historical maize and soybean yields in the United States. **PNAS** 112:14390-14395

Mostofa MG, Hossain MA, Siddiqui MN, Fujita M, Tran L-SP (2017) Phenotypical, physiological and biochemical analyses provide insight into selenium-induced phytotoxicity in rice plants. **Chemosphere** 178:212-223

Moulick D, Ghosh D, Santra SC (2016) Evaluation of effectiveness of seed priming with selenium in rice during germination under arsenic stress. **Plant Physiol Biochem** 109:571-578

Mroczek-Zdyrska M, Strubinska J, Hanaka A (2017) Selenium improves physiological parameters and alleviates oxidative stress in shoots of lead-exposed *Vicia faba* L. minor plants grown under phosphorus-deficient conditions. **J Plant Growth Regul** 36:186-199

Nawaz F, Asraf MY, Ahmad R, Waraich EA, Shabbir RN (2013) Selenium (Se) regulates seedling growth in wheat under drought stress. **Adv Chem** 2013:1-7

Nawaz F, Ahmad R, Ashraf MY, Waraich EA, Khan SZ (2015) Effect of selenium foliar spray on physiological and biochemical processes and chemical constituents of wheat under drought stress. **Ecotoxicol Environ Safety** 113:191-200

Nawaz F, Naeem M, Ashraf MY, Tahir MN, Zulfigar B, Salahuddin M, Shabbir RN, Aslam M (2016a) Selenium supplementation affects physiological and biochemical processes to improve fodder yield and quality of maize (*Zea mays* L.) under water deficit conditions. **Front Plant Sci** 7:1-13

Nawaz F, Ashraf MY, Ahmad R, Waraich EA, Shabbir RN, Hussain RA (2016b) Selenium supply methods and time of application influence spring wheat (*Triticum aestivum* L.) yield under water deficit conditions. **J Agric Sci** 155:643-656

Pandey C, Gupta M (2015) Selenium and auxin mitigates arsenic stress in rice (*Oryza sativa* L.) by combining the role of stress indicators, modulators and genotoxicity assay. **J Hazard Mater** 287:384-391

- Pezzarossa B, Rosellini I, Borghesi E, Tonutti P, Malorgio F (2014) Effects of Se-enrichment on yield, fruit composition and ripening of tomato (*Solanum lycopersicum*) plants grown in hydroponics. **Sci Hortic** 165:106-110
- Pilon-Smits EA, Quinn CF, Tapken W, Malagoli M, Schiavon M (2009) Physiological functions of beneficial elements. **Curr Opin Plant Biol** 12:267-274
- Pommerrening B, Diehn TA, Bienert GP (2015) Metalloido-porins: Essentiality of nodulin 26-like intrinsic proteins in metalloid transport. **Plant Sci** 238:212-227
- Ribeiro DM, Júnior DDS, Cardoso FB, Martins AO, Silva WA, Nascimento VL, Araújo WL (2016) Growth inhibition by selenium is associated with changes in primary metabolism and nutrient levels in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Environ** 39:2235-2246
- Seiter NJ, Greene JK, Reay-Jones FPF (2013) Reduction of soybean yield components by *Megacopta cribraria* (Hemiptera: Plataspidae). **J Econ Entomol** 106:1676-1683
- Silva AJ, Filho JRM, Sales CRG, Pires RCM, Machado EC (2018) Source-sink relationships in two soybean cultivars with indeterminate growth under water deficit. **Bragantia** 77:23-35
- Terry N, Zayed AM, De Souza MP, Tarun AS (2000) Selenium in higher plants. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol** 51:401-432
- Tinker PB (1981) Levels, distribution and chemical forms of trace elements in food plants. **Philos Tr Soc B** 294:41-55
- Wiesner-Reinhold M, Schreiner M, Baldermann S, Schwarz D, Hanschen FS, Kipp AP, Rowan DD, Bentley-Hewitt KL, Mckenzie J (2017) Mechanisms of selenium enrichment and measurement in brassicaceous vegetables, and their application to human health. **Front Plant Sci** 8:1-20
- Zhang Y, Pan G, Chen J, Hu Q (2003) Uptake and transport of selenite and selenate by soybean seedlings of two genotypes. **Plant Soil** 253:437-443
- Zhang M, Tang S, Huang X, Zhang F, Pang Y, Huang Q, Yi Q (2014) Selenium uptake, dynamic changes in selenium content and its influence on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in rice (*Oryza sativa* L.). **Environ Exp Bot** 107:39-45
- Zhang J, Liu J, Yang C, Du S, Yang W (2016) Photosynthetic performance of soybean plants to water deficit under high and low light intensity. **South African Journal of Botany** 105:279-287
- Zieve R, Peterson PJ (1984) The accumulation and assimilation of dimethylselenide by four plant species. **Planta** 160:180-184

CAPÍTULO 1

Selênio como promotor de modificações morfológicas, fisiológicas e anatômicas em soja

Resumo: O selênio (Se) vem sendo fornecido a diferentes espécies vegetais, por meio de diferentes modos de aplicação, por favorecer o crescimento, a fisiologia e o metabolismo das plantas sob condições de desenvolvimento ótimas e de estresse. São poucos os estudos que demonstram como ele pode influenciar a soja, uma espécie economicamente importante, cujo crescimento pode ser alterado, em consequência de vários tipos de estresses. Nesse sentido, o presente estudo investigou efeitos do Se, aplicado via *priming*, pulverização foliar e solução nutritiva em concentrações crescentes, sobre aspectos morfológicos, fisiológicos e anatômicos de plantas de soja. Constatou-se que o fornecimento de Se via *priming* promoveu poucas alterações, a pulverização foliar causou incrementos favoráveis às trocas gasosas e à fluorescência da clorofila *a*, enquanto o tratamento via solução nutritiva reduziu o crescimento das plantas, devido à redução na *An*. Além disso, para os três modos de exposição foram observados efeitos sobre a anatomia foliar. De forma geral, os fatores decisivos para a promoção de modificações induzidas pelo Se em soja, cultivar EMBRAPA 48, foram a própria absorção do Se, o acúmulo de biomassa pelas plantas, as taxas de translocação e a frequência de exposição. Esses fatores favoreceram a indução de um duplo efeito do Se aplicado a 80 μM , sendo ele positivo para a fisiologia das plantas pulverizadas, já que ocorreram incrementos na *An* das plantas, e negativo sobre o crescimento das plantas tratadas via solução nutritiva devido às reduções na *An*, do *qP* e *Y(II)*.

Palavras-chaves: crescimento; efeitos; fluorescência da clorofila; fotossíntese

Selenium as promoter of morphological, physiological and anatomical modifications in soybean

Abstract: Selenium (Se) has been supplied to different plant species, through different modes of application, to favor the growth, physiology and metabolism of plants under optimum conditions of development and stress. There are few studies that demonstrate how it can influence soybeans, an economically important species whose growth can be altered as a result of various types of stress. In this sense, the present study investigated the effects of Se, applied via priming, foliar spraying and nutrient solution in increasing concentrations, on morphological, physiological and anatomical aspects of soybean plants. It was found that the supply of Se *priming* promoted few changes, leaf spray caused favorable increases in gas exchange and chlorophyll fluorescence, while treatment via nutrient solution reduced growth, due to reduction in *Pn*. Furthermore, to the three modes of exposure were observed effects on the leaf anatomy. In general, the decisive factors for the promotion of Se-induced changes in soybean, EMBRAPA 48 grow crop, were the absorption of Se, the accumulation of biomass by the plants, the translocation rates and the frequency of exposure. These factors favored the induction of a double effect of the Se applied to 80 μM , being positive for the physiology of the sprayed plants, since there were increases in the *Pn* of the treated plants, and negative on the growth of the plants treated via nutritive solution due to reductions in the *Pn* of *qP* and *Y(II)*.

Keywords: growth; effects; chlorophyll fluorescence; photosynthesis

1.1 Introdução

O Se é um elemento benéfico à maioria das plantas atuando como promotor do crescimento e indutor de resistência contra condições estressantes (Kaur e Nayyar, 2015; Chauhan et al., 2017; Golob et al., 2017). Por não ser essencial, não há necessidade de realizar suplementação de plantas com Se; no entanto, tal fornecimento pode contribuir para a redução do estresse oxidativo induzido pela senescência (Djanaguiraman et al., 2005), estresse térmico (Iqbal et al., 2015), estresse salino (Kaur e Nayyar, 2015), déficit hídrico (Nawaz et al., 2015), excesso de cobre (Yusuf et al., 2016), arsênio (Chauhan et al., 2017) e radiação ultravioleta

(Katharia e Baghel, 2016; Golob et al., 2017). Dependendo do modo de aplicação, o Se pode ser absorvido pelas plantas em maior ou menor grau.

Naturalmente, o Se é encontrado nos solos, na forma de selenato (SeO_4^{-2}), selenito (SeO_3^{-2}) e seleneto (Se^{-2}), sendo que SeO_4^{-2} se destaca por ser a espécie química de Se mais solúvel e disponível em solos óxicos (Fordyce, 2013). Seu fornecimento via biofortificação pode beneficiar a saúde do homem que vive em locais com baixos níveis de Se em solos, como a China (Chen et al., 2002). Porém, tal fornecimento deve ser monitorado, para que não haja o desenvolvimento de selenose, conforme o observado em crianças da Amazônia brasileira (Maihara et al., 2004). A fertilização com Se, na forma de selenato de sódio, é recomendada na Finlândia (Eurola et al., 1990), onde, também, há comercialização de produtos biofortificados com Se como forma de suplementar a dieta da população e evitar diversos tipos de doenças por carência de Se.

A aplicação de Se pode beneficiar o crescimento das plantas ao favorecer incrementos nos teores de clorofilas, incrementar a fotossíntese, reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e aumentar a atividade de enzimas do sistema antioxidativo (Djanaguiraman et al., 2005; Iqbal et al., 2015; Nawaz et al., 2016). Por outro lado, quando o limiar da ação benéfica para tóxica do Se é ultrapassado, seja pela aplicação de dose elevada ou pelo tempo de exposição excessivo, pode haver fitotoxicidade induzida pelo Se, que se manifesta, através de sintomas de intoxicação e alterações no metabolismo (Lehotai et al., 2012; Hawrilak-Nowak et al., 2015; Ribeiro et al., 2016; Mostofa et al., 2017).

A soja (*Glycine max* L.) é uma espécie vegetal oleaginosa que se destaca mundialmente, como importante fonte de proteína, e no mercado agrícola dos Estados Unidos, China e Brasil, por ser o principal grão produzido e exportado. Ela vem se estabelecendo, como uma das espécies mais estudadas, no intuito de encontrar alternativas que aliviem os efeitos das condições ambientais adversas sobre o seu rendimento. Nesse sentido, surgiram as pesquisas com Se em soja (Ardebili et al., 2014; Djanaguiraman et al., 2005; Hu et al., 2014; Katharia e Baghel, 2016). Elas evidenciam doses e formas de aplicação de Se diferentes e que induzem efeitos positivos nas plantas, em condições ambientais ótimas e/ou de estresse, mas ainda existe uma grande lacuna a respeito das concentrações e modos de aplicação de Se que induzem respostas positivas às plantas de soja. Nesse sentido, fez-se necessário,

investigar as respostas fisiológicas e morfo-anatômicas do cultivar de soja, EMBRAPA 48, ao tratamento com Se.

1.2 Material e Métodos

1.2.1 Condições de cultivo, tratamentos e delineamento experimental

Sementes de soja (*Glycine max* L.), cultivar EMBRAPA 48, foram obtidas a partir do Banco de Sementes do Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja do Bioagro/UFV, selecionadas quanto ao tamanho, cor e forma (visando à homogeneidade) e desinfestadas em hipoclorito de sódio 5%, por cinco minutos. As sementes foram enxaguadas em água destilada, secadas em papel toalha e depositadas sobre papel de germinação (Germitest[®]), o qual foi devidamente umedecido com solução de cloreto de cálcio (CaCl₂) 100 mM, pH 5,5 em quantidade equivalente a 2,5 vezes a massa seca do papel, dentro de placas de *Petri*. Essas placas foram colocadas em sala de crescimento de plantas na ausência de luz a 25 ± 10 °C e umidade relativa do ar de $50 \pm 20\%$. Após sete dias, as plântulas foram transferidas para vasos com capacidade de 1,5 L, contendo solução nutritiva de Clark (Clark, 1975), pH 6,0, sob aeração constante, iluminação com intensidade de $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de radiação fotossinteticamente ativa, que foi medida com um sensor da Licor (Modelo Quantum), e fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, por 28 dias. A cada dois dias, o pH das soluções foi corrigido ao seu valor inicial.

Adicionalmente ao supracitado, como condição de cultivo *número 1* foi realizado o pré-tratamento das sementes, denominado *priming*, com diferentes soluções de Se, na forma de selenato de sódio (Na₂SeO₄) (Sigma Aldrich[®]). Tais sementes permaneceram em processo de embebição por 24 horas, havendo a renovação da solução e do papel de germinação na metade deste período. Como condição de cultivo *número 2* foi realizada a pulverização das plantas, em estágio vegetativo 1-2 (V_1 - V_2) com diferentes concentrações de Se, adicionadas de surfactante (Assist[®]) a 0,1%. As soluções foram aplicadas utilizando-se de um pulverizador com pressão constante entre 8 e 10 horas da manhã, com umidade relativa do ar de 55%, velocidade do vento de 27 km/h e temperatura do ar de 28 °C. O volume de calda calculado para a pulverização foi 342 l/ha e a porcentagem de cobertura da folha foi 54,75%. Como condição de cultivo *número 3*, as plantas em V_1 - V_2 , foram transferidas para vasos contendo solução nutritiva de Clark, suprida

com diferentes concentrações de Se, e nela permaneceram por uma semana. Após esse período, foi realizada a renovação das soluções por soluções nutritivas de Clark, sem a adição de Se, e nela permaneceram por mais uma semana.

Para as três condições experimentais, as soluções de Se foram aplicadas nas concentrações 5, 10, 20, 30, 40 e 80 μM , que foram definidas a partir do limite de toxicidade estabelecido para *Cucumis sativus* (pepino) por Hawrilak-Nowak et al., (2015), por pertencer à uma família botânica filogeneticamente próxima à da soja, segundo a APG 4 (2016). Cada experimento foi realizado em câmara de crescimento de plantas, anexo do BIOAGRO, e foi composto por 35 unidades experimentais, constituídas por sete tratamentos (0, 5, 10, 20, 30, 40 e 80 μM de Se) e cinco repetições, na quantidade de uma planta por vaso. No 28º dia após a semeadura (plantas em V_3 - V_4) foi realizada a coleta de material vegetal para análises de crescimento, concentração de Se e anatomia vegetal, além da análise de parâmetros de fluorescência da clorofila *a* e trocas gasosas. Os vasos foram dispostos de forma inteiramente casualizada.

1.2.2 Determinação das concentrações de Se total

A concentração de Se total (Se-T) foi analisada em cerca de 0,5 g de massa seca moída da parte aérea (folhas e caule) e das raízes das plântulas após 7 dias do *priming* (excepcionalmente para a condição de cultivo *número 1*, para verificar a absorção do Se pelas sementes e a sua acumulação nas plântulas). Análises também foram realizadas após 28 dias do início do experimento, para as três condições de cultivo, em amostras de folhas e raízes das plantas. Para tanto, após a coleta, o material vegetal foi lavado em água corrente e água destilada, para remover o Se adsorvido. O material vegetal foi solubilizado em 2 mL de peróxido de hidrogênio 30% (Merck®) e 6 mL de ácido nítrico 65% (Merck®) a ± 90 °C, por quatro horas, em bloco digestor, conforme proposto por Ellis et al., (2004). O material foi diluído em água ultra pura e as quantificações de Se-T avaliadas por Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES; Perkin Elmer, modelo Optima 8300), com amostrador automático modelo S10 e os resultados expressos em mg.kg^{-1} . A solubilização química foi certificada por meio de amostras de controle interno, cuja recuperação da extração foi de $103 \pm 0,56\%$ e de duas amostras de referência certificada orgânicas, DORM 2 (National Research Council Canada) e IAEA 086 (International Atomic Energy Agency), cujos valores de

recuperação foram, respectivamente, 107 e 100%. O limite de detecção da técnica (LDT) foi calculado para valores inferiores a 0,211 mg.kg⁻¹.

O fator de translocação, que estima a habilidade da planta de translocar metais (Shi et al., 2011), e o fator de bioconcentração, que representa a habilidade da planta de absorver e transportar metal para a parte aérea (Liu et al., 2008), foram calculados com base nas concentrações de Se-T quantificadas nas raízes e nas folhas avaliadas.

1.2.3 Análises de crescimento e determinação do índice de tolerância ao Se

As plantas provenientes da condição de cultivo *número 1* foram mensuradas, quanto ao comprimento da parte aérea e da raiz principal, com auxílio de régua milimetrada, da gema apical ao hipocótilo (parte aérea) e do hipocótilo ao ápice da raiz (raiz principal), após 6, 14, 21 e 28 dias do início da embebição das sementes. As plantas das condições de cultivo *números 2 e 3* foram mensuradas, antes do fornecimento de Se e após 1, 2, 3, 5, 7, 10 e 14 dias do início da exposição (14 dias apenas para a condição de cultivo *número 3*). A partir dessas medições foram determinados os alongamentos relativos [AR (%)] da parte aérea e da raiz principal, conforme proposto por Hunt (1978), onde $AR = (\text{alongamento do tratado final} - \text{alongamento do tratado inicial} / \text{alongamento final controles} - \text{alongamento inicial controles}) * 100$.

A taxa de crescimento relativo (TCR) da parte aérea e da raiz foi determinada a partir da massa seca inicial, obtida por meio da coleta das plantas antes do fornecimento de Se, secagem em estufa a 65 °C por 72 horas e pesagem em balança analítica, e da massa seca final, obtida por meio da coleta no 14º dia após a exposição ao Se, secagem por 72 horas e pesagem conforme a equação proposta por Hunt (1978), em que $TCR = (\ln w_1 - \ln w_0) / (t_1 - t_0) \times 100$; onde, a TCR foi expressa em termos de ganho de massa seca, em gramas, ao longo do período experimental; $\ln w_1$ e $\ln w_0$: logaritmos neperianos da massa seca no final e no início do experimento, respectivamente; e $t_1 - t_0$ a duração do experimento, em dias (28 dias, para a condição de cultivo *número 1*, 10 dias, para a condição de cultivo *número 2* e 14 dias para a condição de cultivo *3*). As plantas da condição de cultivo *número 3* se desenvolveram mais rapidamente, quando comparadas às plantas cultivadas em solução nutritiva, enriquecida com Se, e por meio do *priming*, tal desenvolvimento

exigiu a redução do período de exposição ao Se, de 14 para 10 dias, para que todas as plantas fossem avaliadas no mesmo estágio de desenvolvimento (V_3 - V_4).

A área foliar foi obtida no segundo trifólio por meio de um integrador de área foliar (Modelo Licor 3100), e os dados expressos em centímetros quadrados.

Para avaliar a tolerância das plantas ao Se, calculou-se o índice de tolerância (IT) ($IT = \text{massa seca das plantas tratadas com Se} / \text{massa seca das plantas controle}$) (Souza et al., 2012), separadamente para a parte aérea e para a raiz.

1.2.4 Determinação dos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* e de trocas gasosas

Os parâmetros de fluorescência no escuro, fluorescência inicial (F_o), fluorescência variável (F_v), fluorescência máxima (F_m) e rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m) foram obtidos na antemanhã. Concomitantemente as medições de trocas gasosas aferiu-se os parâmetros de fluorescência no claro, fluorescência máxima no período iluminado (F_m') e fluorescência no estado estacionário (F_s), que foram determinados entre 8:00 e 10:00 h da manhã. Todas as análises foram realizadas no folíolo central do segundo trifólio totalmente expandido com auxílio do IRGA. A partir dos parâmetros de fluorescência obtidos no escuro e no claro foram calculados a fluorescência inicial no período iluminado (F_o'), fluorescência variável no período iluminado (F_v'), rendimento quântico efetivo do fotossistema II (F_v'/F_m'), o coeficiente do *quenching* fotoquímico (qP), o coeficiente do *quenching* não-fotoquímico (qN), a taxa de transporte de elétrons (ETR), o rendimento quântico efetivo do fotossistema II [$Y(II)$], o *quenching* não fotoquímico indicativo da dissipação de energia via ciclo das xantofilas [$Y(NPQ)$], o *quenching* fotoquímico das perdas não-reguladas [$Y(NO)$] e o *quenching* não-fotoquímico (NPQ).

Os parâmetros de trocas gasosas: assimilação líquida de CO_2 (A_n), condutância estomática (g_s), taxa transpiratória (E) e concentração interna de CO_2 (C_i); foram determinados entre 8:00 e 10:00 horas da manhã, também no folíolo central do segundo trifólio totalmente expandido, com auxílio do IRGA, utilizando $500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ de radiação fotossinteticamente ativa, que foi estabelecida com base em curvas de luz elaboradas no dia anterior ao da avaliação fotossintética, com concentração de CO_2 ambiente (C_a).

1.2.5 Caracterização anatômica e histométrica de folhas e raízes

A porção mediana do folíolo central da folha mais nova e totalmente expandida e amostras de 2 cm de segmento da raiz principal, a partir do ápice, foram fixadas em formaldeído:ácido acético 50% e desidratadas em série etílica a 70, 80, 90 e 100%, sequencialmente, por 2 horas para cada concentração. O material foi infiltrado e incluído em historesina metacrilato (Leica Historesin[®] Plus), conforme as recomendações do fabricante, e afixados em blocos de madeira. Os cortes foram realizados transversalmente em micrótomo rotativo e depositados em lâmina de vidro. A coloração foi realizada mantendo-se o material imerso por 4 min em solução de azul de toluidina a 0,05% em pH 4,0 (O'Brien et al., 1964) e, em seguida, lavados em água corrente. Após a secagem, as lâminas foram montadas em resina *Permaunt*. A captura das imagens foi realizada por meio de microscópio óptico (modelo AX70 com sistema de captura de imagem acoplado AxioCam HRc – Zeiss) e as imagens foram capturadas com zoom óptico de 10x e zoom digital de 1,5x. As análises histométricas das imagens foram realizadas por meio do programa Image Pro-Plus Versão 4.5.029. Para essa avaliação, foram analisadas a região da nervura central, do limbo e o ápice da raiz, de três repetições de cada tratamento, cada uma delas com cinco sub-repetições, e os dados expressos em milímetros quadrados (região da nervura central e do ápice da raiz) e milímetros (região do limbo).

1.2.6 Análises Estatísticas

A significância da diferença entre as médias das repetições foi testada por meio da análise de variância paramétrica (*ANOVA*), com a mínima diferença significativa entre os tratamentos verificada ao nível de significância de 5%, subsidiada pelo teste de comparações múltiplas de *Scott-Knott* ($p < 0,05$). Para os dois testes, os dados atenderam a pressuposição de normalidade, pela aplicação do teste de *Kolmogorov-Smirnov* ($p > 0,05$). Quando os dados não seguiram a normalidade foram submetidos à análise de variância não-paramétrica de *Kruskall-Wallis* e ao teste de comparações múltiplas de *Dunn* ($p < 0,05$). Para alguns parâmetros foram realizados testes t, para realizar comparação de médias, para outros, foram realizadas análises de regressão, a fim de verificar o grau de associação entre as variáveis analisadas e seus tratamentos. As análises foram executadas no programa *R*[®] (versão 3.4.4) e os gráficos elaborados no programa *Prisma 5*[®].

1.3 Resultados

1.3.1 Concentração de Se-T em folhas e raízes de plantas de soja

A análise de Se total (Se-T), da parte aérea e das raízes das plântulas e plantas controle (0 μM), evidenciou que no cultivar E48 ocorre a transferência de parte do Se presente na planta-mãe, para a parte aérea das plantas-filhas (Tabelas 1-4). Tal análise também demonstrou que, após sete dias do *priming*, houve a absorção do Se fornecido às sementes, apenas quando aplicado a 30 e 80 μM (Tabela 1), evidenciando aumento de 114 e 180% de Se, em relação ao tratamento controle (0 μM), respectivamente.

O teste de comparações múltiplas evidenciou o acúmulo de Se na parte aérea das plântulas, cujas sementes foram tratadas com 30 e 80 μM . Além disso, os resultados evidenciaram a ocorrência de translocação de Se (FT), apenas nas plântulas que foram tratadas com 20 a 80 μM , bem como a sua acumulação na parte aérea [FB (PA)] daquelas tratadas com 30 e 80 μM . Não foram verificadas diferenças significativas para o acúmulo de Se nas raízes dessas plântulas (*ANOVA*; $p > 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração de Se total (Se-T) na parte aérea e nas raízes das plântulas do cultivar de soja EMBRAPA 48, após sete dias de tratamento com Se via *priming*.

Se (μM)	Se-T (mg.kg^{-1})*			
	Parte aérea **	Raiz ***	FT **	FB (PA)
0	0,64 \pm 0,03 c	nd	na	na
5	0,44 \pm 0,02 c	nd	na	na
10	0,56 \pm 0,028 c	0,53 \pm 0,10	1,12 \pm 0,27	na
20	0,55 \pm 0,02 c	0,65 \pm 0,12	0,88 \pm 0,20	na
30	1,36 \pm 0,14 b	1,11 \pm 0,36	1,33 \pm 0,30	0,31 \pm 0,01
40	0,59 \pm 0,09 c	1,27 \pm 0,17	1,60 \pm 1,32	na
80	1,78 \pm 0,03 a	1,15 \pm 0,24	1,63 \pm 0,37	0,18 \pm 0,01

* Médias de duas repetições (constituídas por amostras compostas de cinco repetições, por tratamento; tendo em vista, a indisponibilidade de massa seca).

** Médias \pm erro padrão da média, acompanhados pela mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de *Scott-Knott* a 5 % de probabilidade.

*** Sem diferenças significativas, pois ($p > 0,05$).

nd: abaixo do LDT.

na: não se aplica.

Os resultados do teste de comparações múltiplas também indicaram que as folhas das plantas tratadas com *priming* a 30 μM foram as que apresentaram o maior valor médio de Se-T. Tendo em vista que tal acúmulo foi observado apenas para as

raízes das plantas provenientes dos tratamentos com 10 e 80 μM , pode-se inferir que, o fornecimento de Se via *priming* exerceu efeitos pontuais sobre a sua translocação e acumulação nas plantas (Tabela 2).

Tabela 2. Concentrações de selênio total [Se-T] do cultivar de soja EMBRAPA 48, no estágio V_3-V_4 , após tratamento com diferentes concentrações de Se via *priming*.

[Se-T]	Folhas	Raízes	FT	FB (PA)
0	$0,63 \pm 0,11$ b	nd	na	na
5	$0,66 \pm 0,02$ b	nd	na	$0,31 \pm 0,01$
10	$0,50 \pm 0,04$ b	$0,31 \pm 0,00$	$0,10 \pm 0,00$	na
20	$0,51 \pm 0,04$ b	nd	na	na
30	$1,13 \pm 0,07$ a	nd	na	$0,21 \pm 0,01$
40	$0,37 \pm 0,03$ b	nd	na	na
80	$0,63 \pm 0,12$ b	$1,05 \pm 0,08$	$0,16 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,01$

Para legenda vide tabela 1.

Para o fornecimento de Se via pulverização, as maiores concentrações de Se-T foram verificadas nas folhas das plantas tratadas com 20, 30 e 80 μM . Para tal modo de aplicação, não houve acúmulo de Se nas raízes, portanto, não foi possível constatar a sua translocação (FT), no entanto houve a sua acumulação na parte aérea [FB (PA)], das plantas tratadas com 20 a 80 μM (Tabela 3).

Tabela 3. Concentrações de selênio total [Se-T] do cultivar de soja EMBRAPA 48, no estágio V_3-V_4 , após tratamento com diferentes concentrações de Se via pulverização.

[Se-T]*	Folhas	Raiz	FT	FB (PA)
0	$0,77 \pm 0,01$ b	nd	na	na
5	$0,76 \pm 0,01$ b	nd	na	na
10	$0,70 \pm 0,05$ b	nd	na	na
20	$1,10 \pm 0,10$ a	nd	na	$0,21 \pm 0,01$
30	$1,09 \pm 0,03$ a	nd	na	$0,12 \pm 0,01$
40	$0,99 \pm 0,00$ b	nd	na	$0,07 \pm 0,00$
80	$1,28 \pm 0,10$ a	nd	na	$0,08 \pm 0,00$

Para legenda vide tabela 1.

Adicionalmente, o fornecimento de Se via solução nutritiva foi o responsável pelos maiores valores médios de Se-T, nas folhas e nas raízes das plantas (Tabela 4). Esses valores foram diretamente proporcionais às concentrações de Se fornecidas e aumentaram de forma linear, conforme evidenciaram os modelos de regressão ajustados para as folhas e para as raízes (Figura 1).

Tabela 4. Concentrações de selênio total [Se-T] do cultivar de soja EMBRAPA 48, no estágio V_3-V_4 , após tratamento com diferentes concentrações de Se via solução nutritiva.

[Se-T]	Folhas	Raiz	FT	FB (PA)
0	0,90 ± 0,05 f	nd	na	na
5	13,42 ± 0,85 f	11,96 ± 0,06 f	1,12 ± 0,06	na
10	36,79 ± 0,11 e	50,14 ± 0,59 e	0,73 ± 0,01	32,01 ± 0,00
20	174,18 ± 8,43 d	98,52 ± 3,66 d	1,77 ± 0,15	41,86 ± 0,01
30	378,51 ± 10,04 c	126,23 ± 1,41 c	3,00 ± 0,11	45,93 ± 0,01
40	487,97 ± 10,31 b	205,54 ± 3,66 b	2,37 ± 0,09	50,95 ± 0,00
80	750,37 ± 0,50 a	398,37 ± 6,01 a	1,88 ± 0,03	46,07 ± 0,00

Para legenda vide tabela 1.

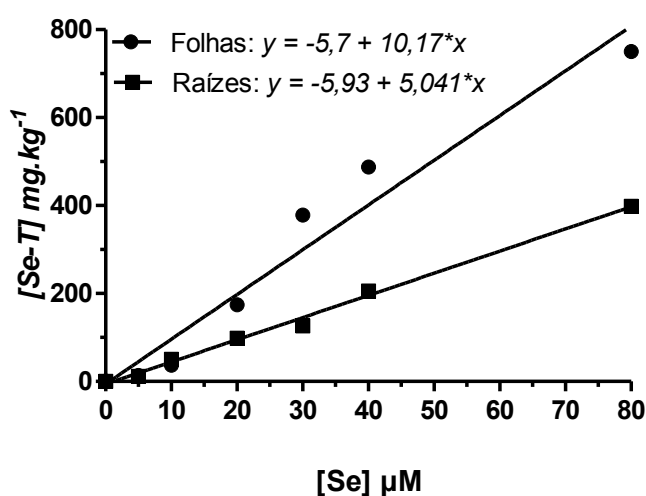


Figura 1. Modelos de regressão ajustados para as concentrações médias de Se-T em folhas e raízes do cultivar de soja EMBRAPA 48, após 14 dias de tratamento com Se via solução nutritiva.

* Modelos significativos.

1.3.2 Avaliação morfológica das plantas tratadas com Se

As plantas supridas com Se via *priming* apresentaram alterações morfológicas do primeiro par de folhas trifolioladas, desde o início do seu desenvolvimento e, a partir da aplicação de 10 μM (Figura 2A-D). Essas folhas apresentaram deformações, caracterizadas por tamanhos reduzidos e formatos irregulares, que foram mais evidentes nas folhas das plantas cujas sementes foram supridas com 30, 40 e 80 μM de Se (Figura 2C). Nenhuma modificação no alongamento, cor ou volume de raízes foi constatada.

As plantas pulverizadas com Se a 40 e a 80 μM se destacaram por serem mais vigorosas, pelo desenvolvimento mais rápido e ausência de atrofia. Nenhuma alteração foi verificada, no que diz respeito ao tamanho ou contorno das folhas (Figura 3A) e no alongamento, cor ou volume das raízes (Figura 3B). Além disso, as

plantas pulverizadas exibiram maior alongamento do caule, sustentação das folhas e, conseqüentemente, melhor aspecto da sua parte aérea, quando comparadas às plantas controle. Por outro lado, foi verificada a redução no vigor das plantas pulverizadas com 20 μM (Figura 3C), que foi manifestada pela aparente redução da parte aérea das plantas, conforme o observado pela avaliação visual/qualitativa.

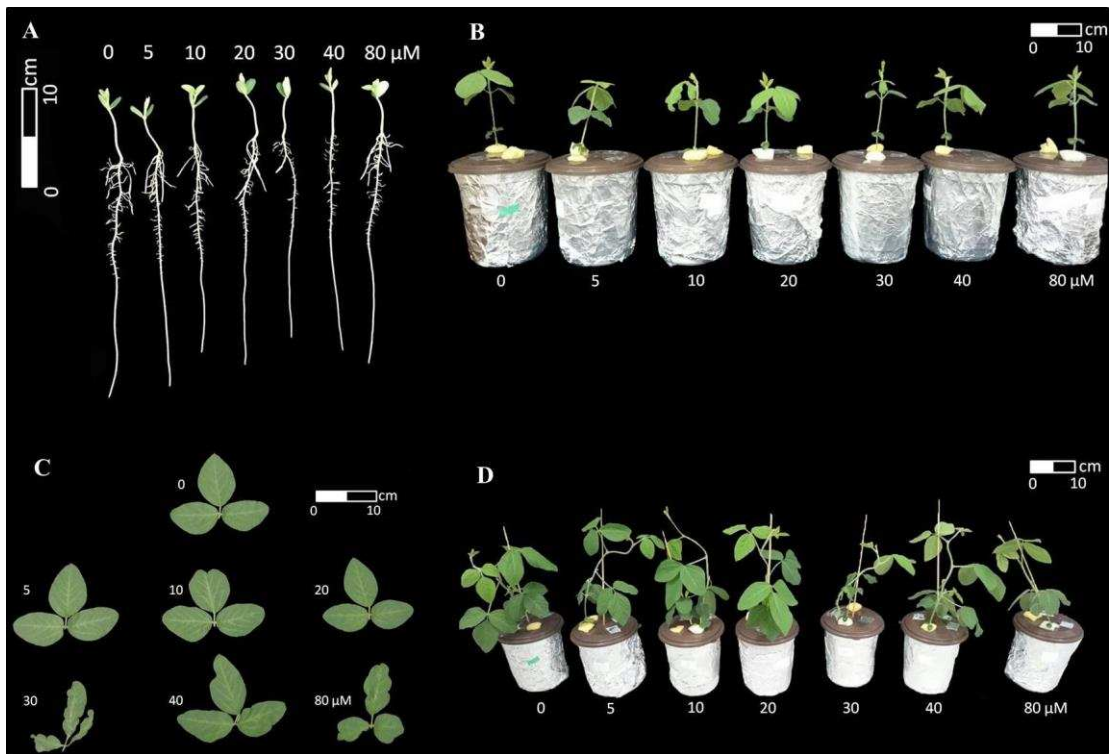


Figura 2. Plântulas e plantas do cultivar de soja EMBRAPA 48 após tratamento via *priming* das sementes com Se. Plântulas após sete dias de tratamento com concentrações crescentes de Se (A). Plantas em V_1 - V_2 , após 14 dias do tratamento (B). Detalhe do primeiro trifólio totalmente expandido das plantas, após 28 dias do início do tratamento (C). Detalhe da parte aérea das plantas supridas com Se, após 28 dias do início do tratamento (D).

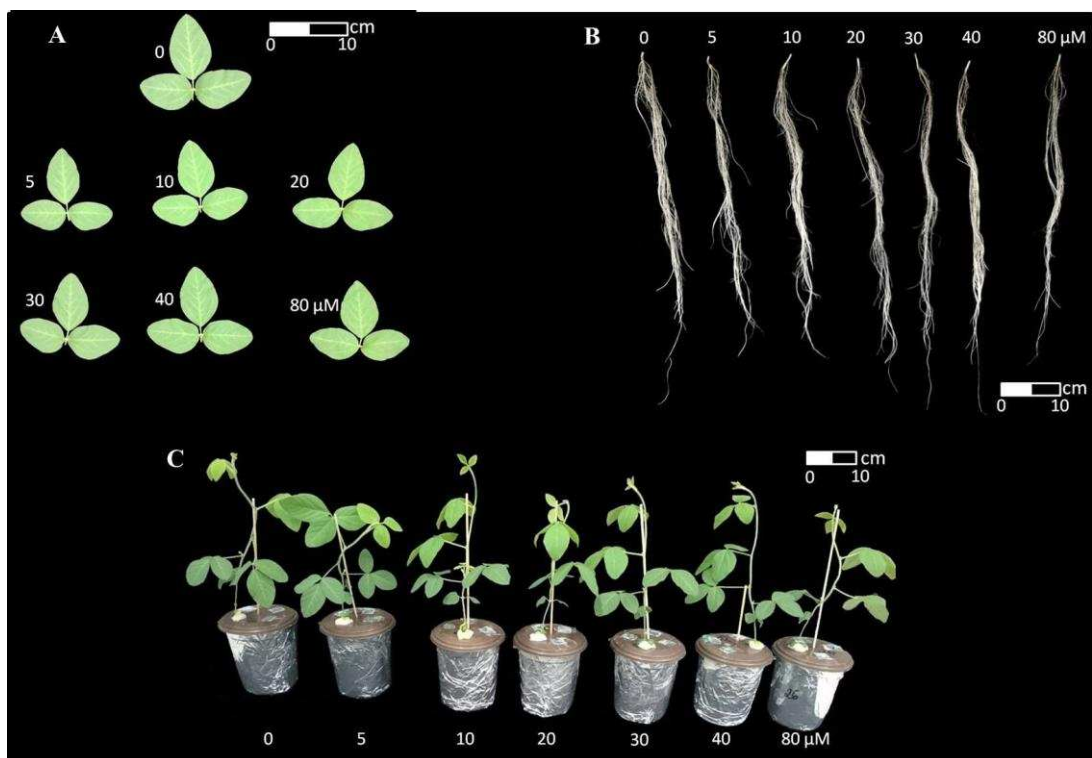


Figura 3. Plantas do cultivar de soja EMBRAPA 48 após pulverização das folhas com Se. Detalhe do primeiro trifólio totalmente expandido após 10 dias do tratamento (A). Detalhe do comprimento das raízes após 10 dias do tratamento (B). Detalhe da parte aérea das plantas após 10 dias do tratamento (C).

As plantas tratadas com 5 a 40 μM de Se via solução nutritiva não apresentaram alterações morfológicas. No entanto, àquelas tratadas com 80 μM apresentaram sintomas visuais de fitotoxicidade, após dois dias de exposição a esse elemento, que se manifestaram por meio do aparecimento de pequenos pontos de cor púrpura nas folhas unifolioladas (Figura 4A). Esses pontos continuaram a aumentar e a se espalhar por toda a folha, evoluindo para áreas com coloração amarelada, seguida por manchas cor de ferrugem, ambas características de áreas cloróticas e necróticas, no quinto dia de exposição (Figura 4B). Com a evolução da toxicidade, observou-se que no sétimo dia, após o início do tratamento, ocorreu a abscisão das folhas unifolioladas, o encarquilhamento das folhas jovens, o aparecimento de áreas com coloração púrpura nos folíolos do primeiro trifólio e a atrofia da parte aérea (Figura 4D,E). Adicionalmente, constatou-se redução do alongamento da raiz principal e do número de raízes laterais, conforme o aumento na concentração de Se fornecida às plantas (Figura 4C-D).

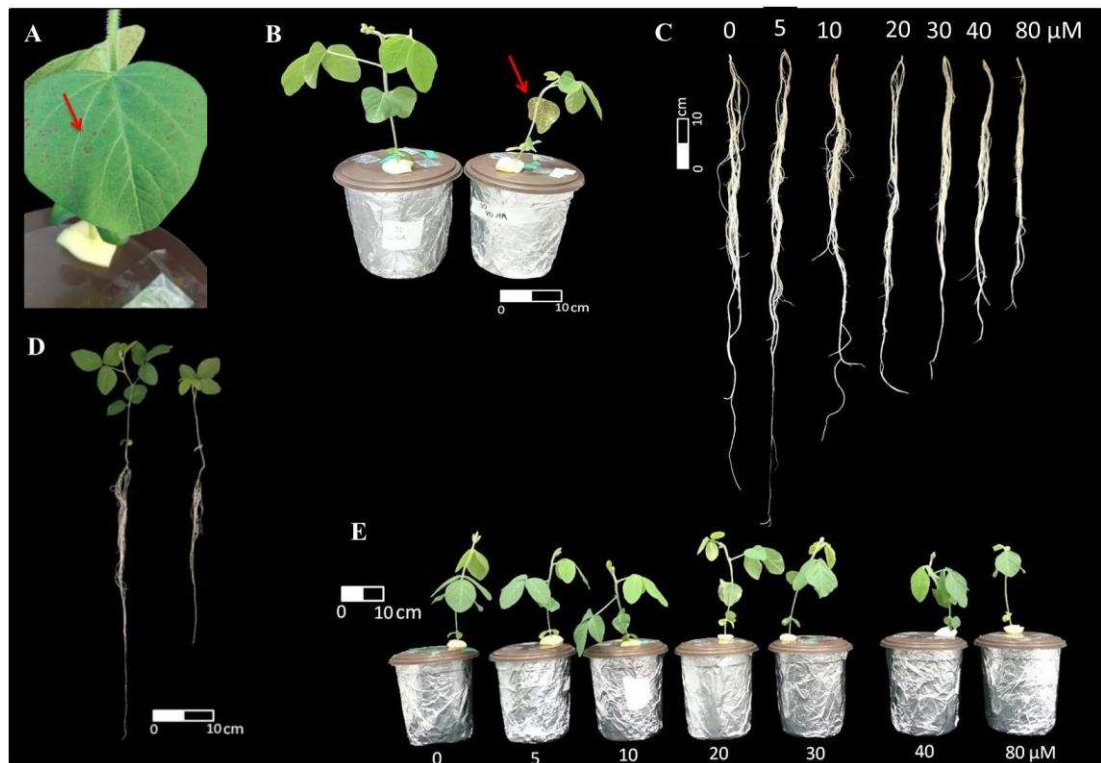


Figura 4. Plantas do cultivar de soja EMBRAPA 48 após tratamento com Se na solução nutritiva. Detalhe do primeiro par de folhas unifolioladas após dois dias do início do tratamento com 80 μM de Se, seta indica pontos púrpuros (A). Parte aérea da planta controle (à esquerda) e da planta tratada com 80 μM (à direita), após cinco dias do início do tratamento, seta indica áreas cloróticas e necróticas (B). Detalhe do comprimento das raízes das plantas, após sete dias do início do tratamento (C). Planta controle (à esquerda) e planta tratada a 80 μM (à direita), após sete dias do início do tratamento (D). Visão geral da parte aérea das plantas cultivadas em solução nutritiva de Clark com concentrações crescentes de Se (E).

1.3.3 Análises de crescimento e índice de tolerância

Para o modo de fornecimento de Se via *priming* não foram observados efeitos sobre o alongamento relativo da parte aérea e da raiz das plantas (ANOVA; $p > 0,05$). Semelhantemente, não foram observados efeitos do fornecimento de Se sobre as raízes das plantas suplementadas via pulverização (ANOVA $p > 0,05$). Porém, os resultados de alongamento relativo da parte aérea evidenciaram efeitos positivos do tratamento com Se, sobre o alongamento relativo das plantas supridas com Se, via pulverização com 30 a 80 μM , no 1° dia após a exposição (DAE) e com 5, 20, 40 e 80 μM no 10° DAE (Scott-Knott; $p < 0,05$). Tais efeitos devem-se a aumentos significativos do alongamento relativo da parte aérea dessas plantas (Figura 5).

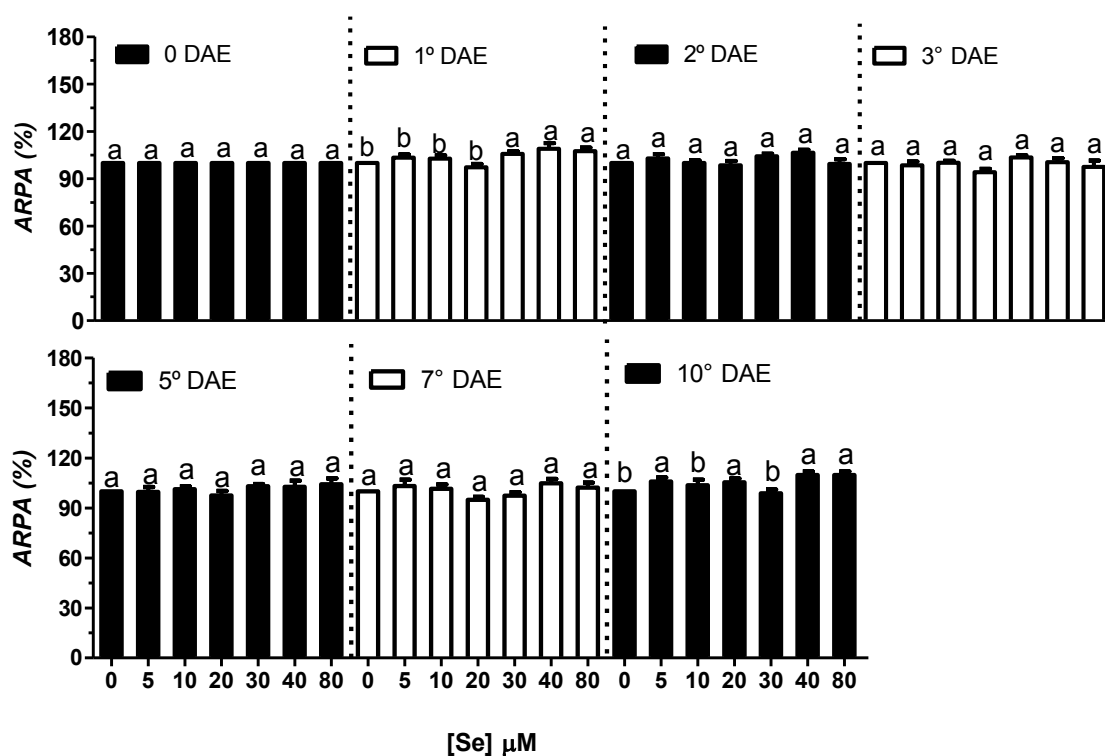


Figura 5. Efeitos de concentrações crescentes de Se sobre a porcentagem de alongamento relativo da parte aérea do cultivar de soja Embrapa 48, ao longo do tempo de exposição a este elemento, via pulverização. DAE: dias após a exposição ao Se. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas resultantes do teste de *Scott-Knott* ($p < 0,05$). Dados são médias \pm erro padrão de cinco repetições.

O fornecimento de Se via solução nutritiva demonstrou que, no 10º dia após a exposição (DAE), houve um efeito positivo pontual do fornecimento de Se sobre o alongamento relativo da raiz principal das plantas supridas com 10 µM de Se, em relação às plantas controle (*Scott-Knott*; $p < 0,05$) (Figura 6A). No entanto, no 14º dia, tal efeito deixou de ser manifestado e observou-se apenas a redução de tal alongamento nas plantas tratadas com Se de 20 a 80 µM (Figura 6B). Porventura, em vez de incrementar, o fornecimento de Se via solução nutritiva reduziu o alongamento relativo da parte aérea das plantas supridas com 80 µM de Se, no 10º DAE (*Kruskall-Wallis*; $p < 0,05$), e das plantas supridas com 30, 40 e 80 µM de Se, no 14º DAE (*Kruskall-Wallis*; $p < 0,05$) (Figura 6B).

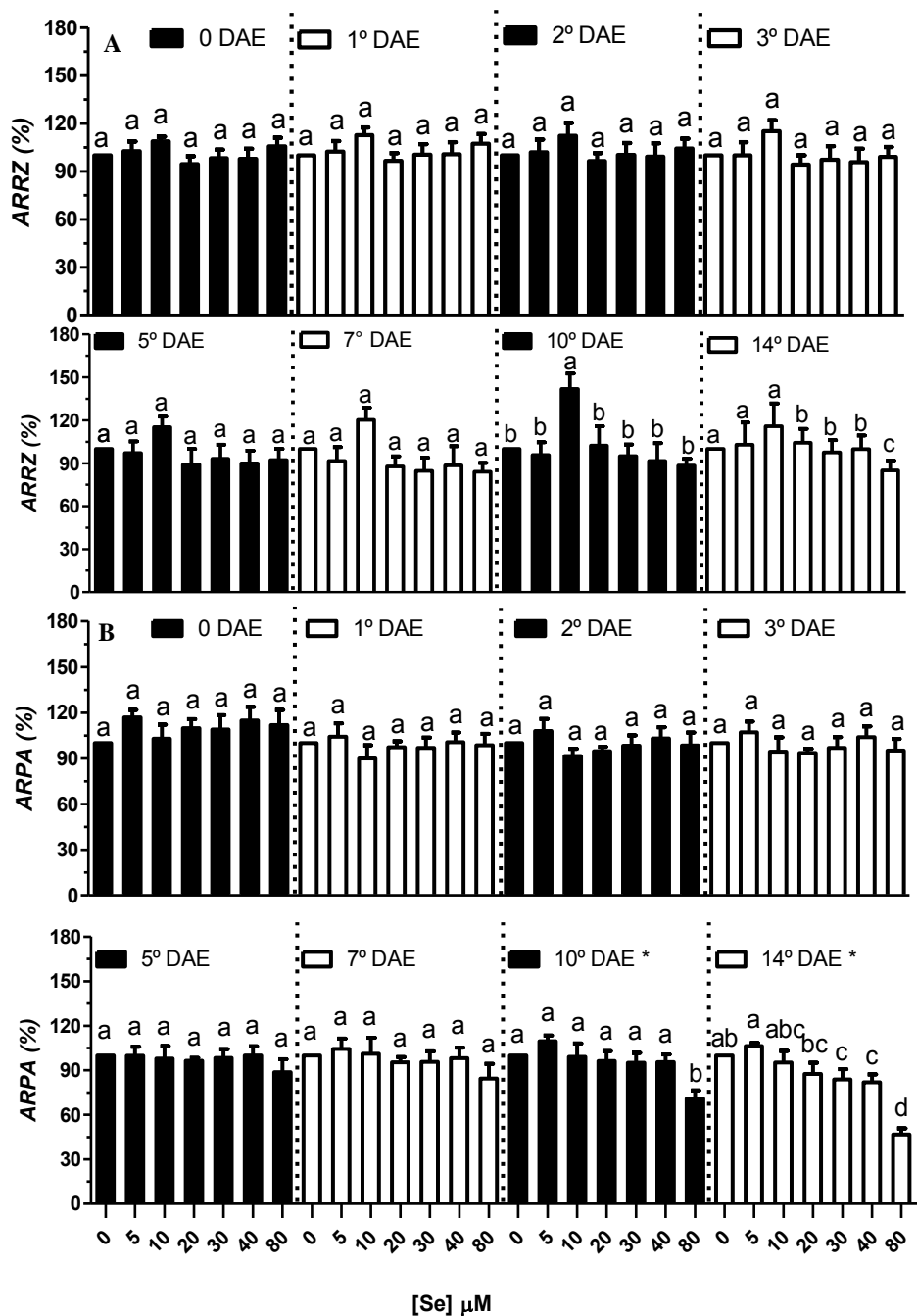


Figura 6. Efeitos de diferentes concentrações de Se sobre a porcentagem de alongamento relativo da raiz principal (ARRZ%) (A) e da parte aérea (ARPA%) (B) do cultivar de soja Embrapa 48, ao longo do tempo de exposição a este elemento na solução nutritiva. DAE: dias após a exposição ao Se. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas resultantes do teste de *Scott-Knott* ($p < 0,05$). * Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas resultantes do teste de *Dunn* ($p < 0,05$). Dados são médias \pm erro padrão de cinco repetições.

Dentre os três modos de aplicação de Se, a área foliar foi maior nas plantas que foram pulverizadas com 20 μM (Figura 7). Adicionalmente, a área foliar das plantas supridas com 80 μM de Se via solução nutritiva, destacou-se por apresentar reduções, enquanto a das plantas tratadas via *priming* apresentou reduções devido à

aplicação de 30 μM de Se. As plantas pulverizadas não apresentaram alterações em sua área foliar, quando comparadas às suas plantas controles.

Não foram observados efeitos do tratamento com Se sobre a razão parte aérea-raiz e as taxas de crescimento relativo da parte aérea e da raiz das plantas suplementadas via *priming* e via pulverização (ANOVA; $p > 0,05$). No entanto, foram verificados efeitos sobre a razão parte aérea-raiz e as taxas de crescimento relativo da parte aérea e da raiz das plantas suplementadas por meio da solução nutritiva de Clark, enriquecida com Se (Figura 8A-B).

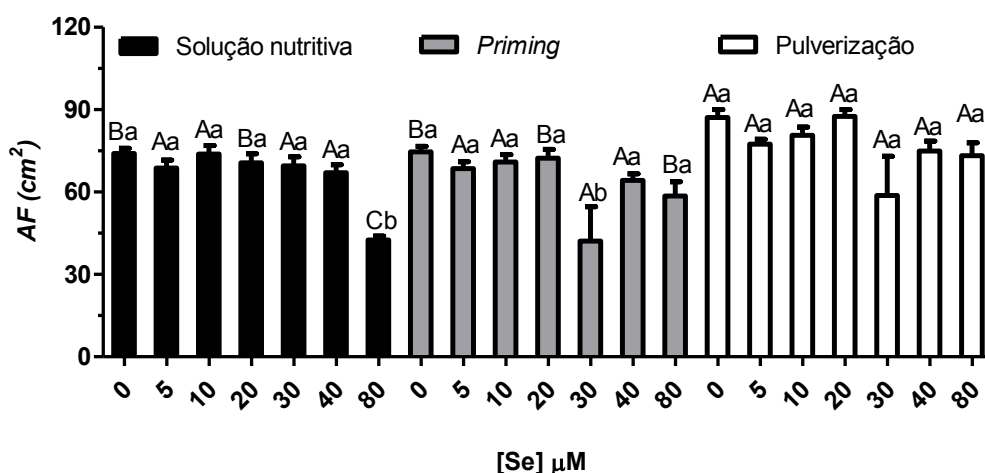


Figura 7. Área foliar do segundo trifólio do cultivar de soja Embrapa 48, tratada com Se via solução nutritiva, *priming* e pulverização, respectivamente, no estágio vegetativo V_3 - V_4 . Médias \pm erro padrão da média acompanhados pela mesma letra dentro e entre cada tratamento não diferem estatisticamente pelo teste de *Scott-Knott* a 5% de probabilidade. Dados são médias \pm erro padrão de cinco repetições.

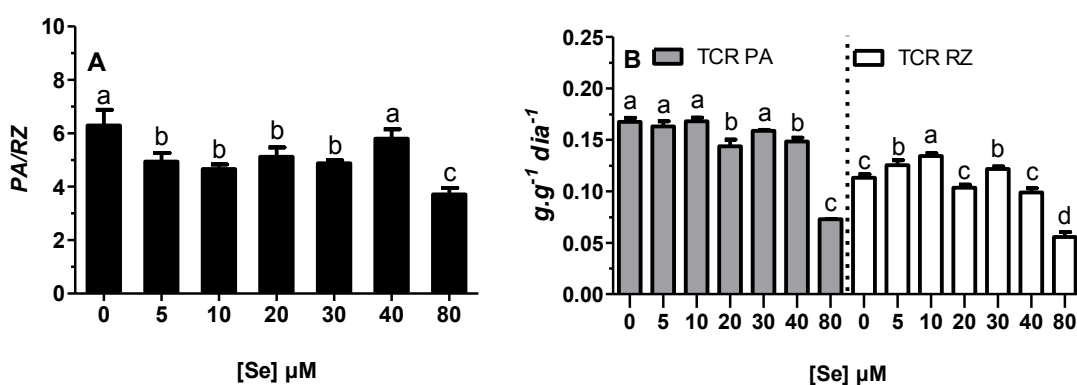


Figura 8. Efeitos de concentrações crescentes de Se sobre o crescimento do cultivar de soja Embrapa 48, suplementado com Se via solução nutritiva. Parâmetros: razão parte aérea raiz (PA/RZ) (A), taxa de crescimento relativo da parte aérea (TCR PA) e da raiz (TCR RZ) (B). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas resultantes do teste de *Scott-Knott* ($p < 0,05$). Dados são médias \pm erro padrão de cinco repetições.

O fornecimento de Se via *priming* e pulverização, não causou alterações no índice de tolerância das plantas ao tratamento com Se (ANOVA; $p > 0,05$). Porém, observou-se que o tratamento com Se via solução nutritiva foi tóxico para as folhas tratadas com 20, 40 e 80 μM . Tal tratamento incrementou a tolerância das raízes ao Se, a 10 μM (Figura 9).

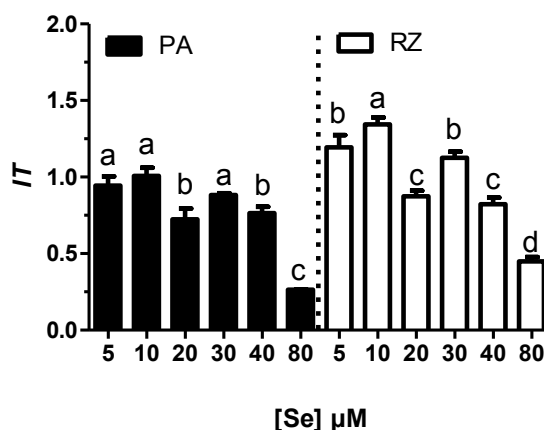


Figura 9. Efeitos de concentrações crescentes de Se sobre o índice de tolerância (*IT*) da parte aérea (PA) e da raiz (RZ) do cultivar de soja Embrapa 48 ao tratamento via solução nutritiva. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas resultantes do teste de *Scott-Knott* ($p < 0,05$). Dados são médias \pm erro padrão de cinco repetições.

Modelos de regressão linear foram ajustados para a variável massa seca total, das plantas supridas com Se via *priming* e solução nutritiva (Figura 10). Esses modelos evidenciaram reduções significativas na massa seca dessas plantas, conforme houve aumento na concentração de Se fornecida. Nenhum modelo foi ajustado nas plantas suplementadas via pulverização (ANOVA; $p > 0,05$).

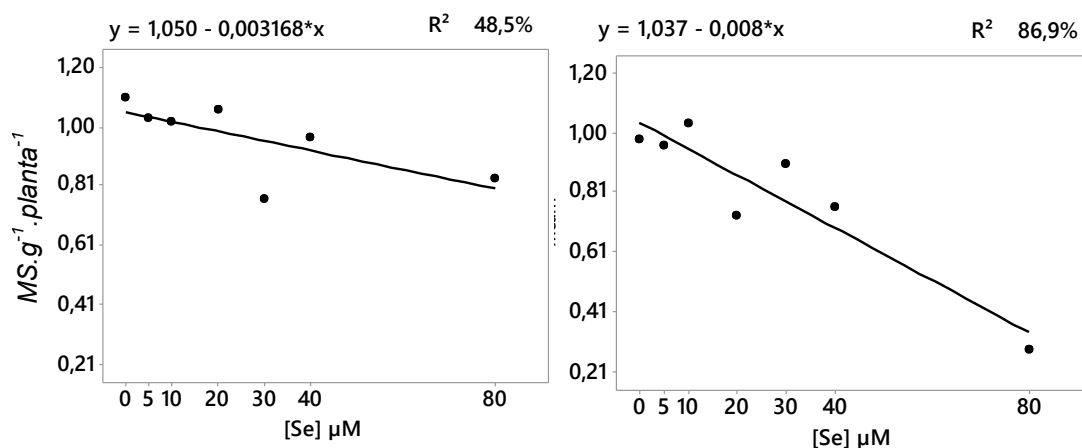


Figura 10. Modelos de regressão ajustados para a massa seca total do cultivar de soja EMBRAPA 48, em função das concentrações de Se aplicadas via *priming* (A) e via solução nutritiva (B). *Modelos significativos.

1.3.4 Parâmetros de trocas gasosas e de fluorescência da clorofila *a*

O fornecimento de Se via *priming* não alterou as trocas gasosas e a fluorescência da clorofila *a* das plantas (ANOVA; $p > 0,05$). Já o fornecimento de Se via pulverização incrementou a *An* das plantas em todas as concentrações (Figura 11A) e a *gs* daquelas supridas com 5, 10, 30, 40 e 80 μM (Figura 11B). Dessa forma, constatou-se que a aplicação de Se incrementou a *An* das plantas, sem exercer influência sobre o acúmulo de biomassa. Já para o modo de fornecimento de Se via solução nutritiva, foram observadas reduções na *An*, a partir da aplicação de 30 μM (Figura 11C) e na *E* (Figura 11D), devido ao fornecimento de 40 e 80 μM . De forma geral, o tratamento com Se via pulverização elevou a *An* das plantas para todas as concentrações, quando comparadas às tratadas via solução nutritiva (Figura 11E).

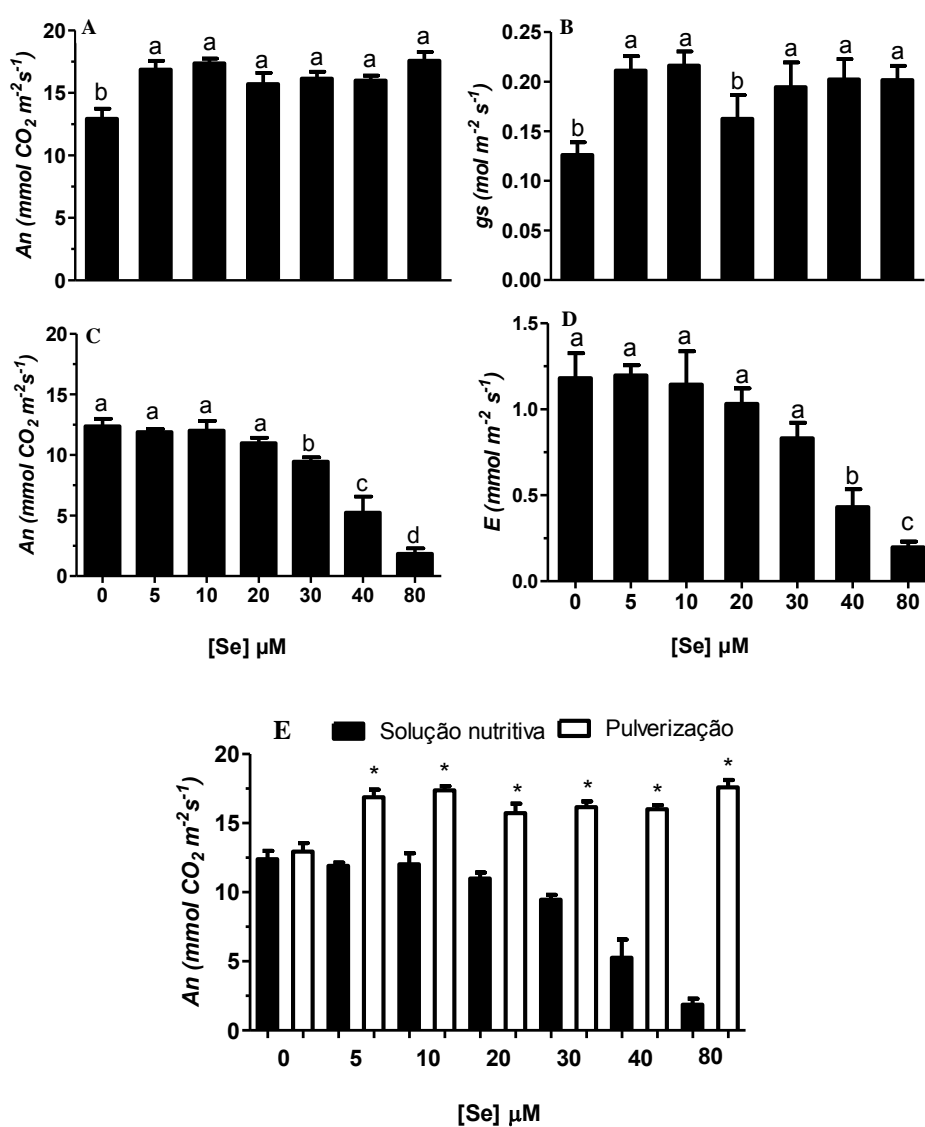


Figura 11. Efeitos de concentrações crescentes de Se sobre as trocas gasosas do cultivar de soja Embrapa 48. Parâmetros: assimilação líquida de CO_2 (*An*) (A) e condutância estomática (*gs*) (B) após

tratamento via pulverização. Assimilação líquida de CO₂ (*A_n*) (C) e taxa transpiratória (*E*) após tratamento via solução nutritiva (D). Comparação da assimilação líquida de CO₂ (*A_n*) em plantas de soja tratadas via solução nutritiva e pulverização (E). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas para os tratamentos segundo o teste de *Scott-Knott* ($p < 0,05$). * Indica diferenças significativas entre os modos de aplicação de Se, segundo resultados do teste *t*. Dados são médias \pm erro padrão de cinco repetições.

A fluorescência da clorofila *a* não foi influenciada pela aplicação do Se via *priming* (ANOVA; $p > 0,05$); porém, o fornecimento de Se via pulverização, favoreceu incrementos em *Y(II)*, *qP* e *ETR* (Figura 12A-C). Tais alterações evidenciaram que, em soja sob a influência de Se fornecido via pulverização, há o aumento do *Y(II)*, do *qP* e da *ETR*. Nas plantas tratadas via solução nutritiva, foram observadas alterações na *Fm*, *Y(II)*, *NPQ*, *qP*, *qN*, *ETR* e *Y(NO)*, principalmente, sob a influência do fornecimento de 40 e 80 μM (Figura 13A-H). Tais alterações evidenciaram reduções na taxa fotossintética das plantas, devido ao fornecimento de Se. Efeitos antagônicos sobre *Y(II)*, *qP* e *ETR* foram observados sobre as duas formas de aplicação de Se supracitadas, sugerindo que tais parâmetros podem estar relacionados diretamente com o limiar de alteração da ação benéfica para tóxica do Se (Figura 14A-C).

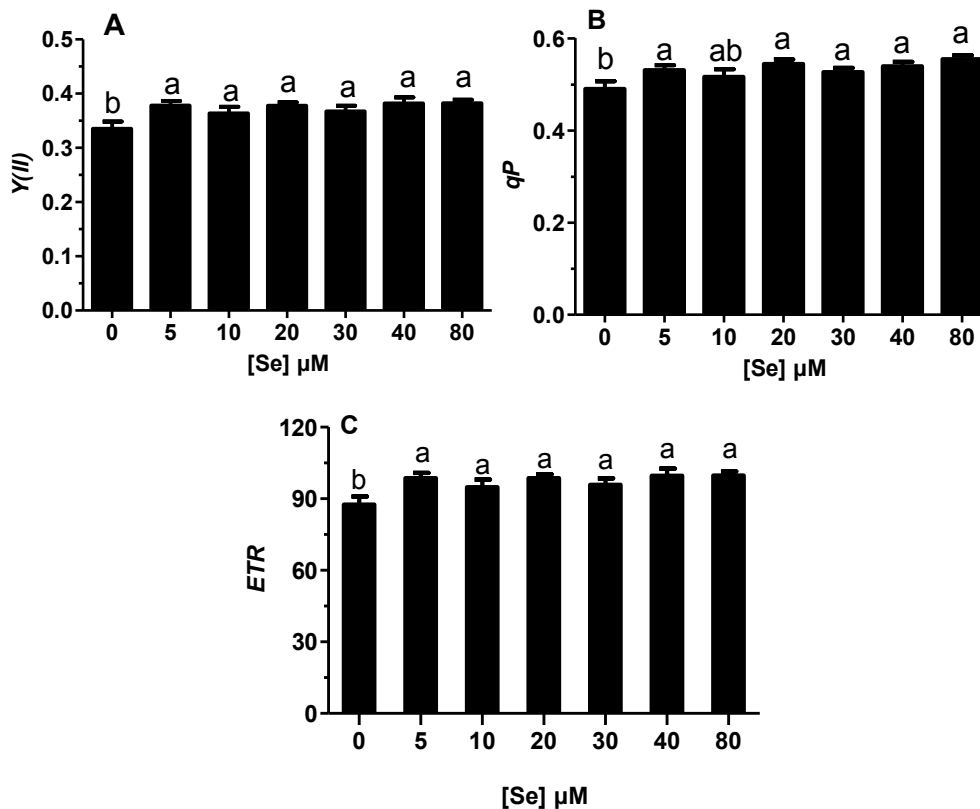


Figura 12. Efeitos da pulverização de Se sobre a fluorescência da clorofila *a* do cultivar de soja EMBRAPA 48. Parâmetros: rendimento quântico efetivo do fotossistema II [*Y(II)*] (A), *quenching*

fotoquímico (qP) (E) e taxa de transporte de elétrons (ETR) (G). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas resultantes do teste de *Scott-Knott* ($p < 0,05$). Dados são médias \pm erro padrão de cinco repetições.

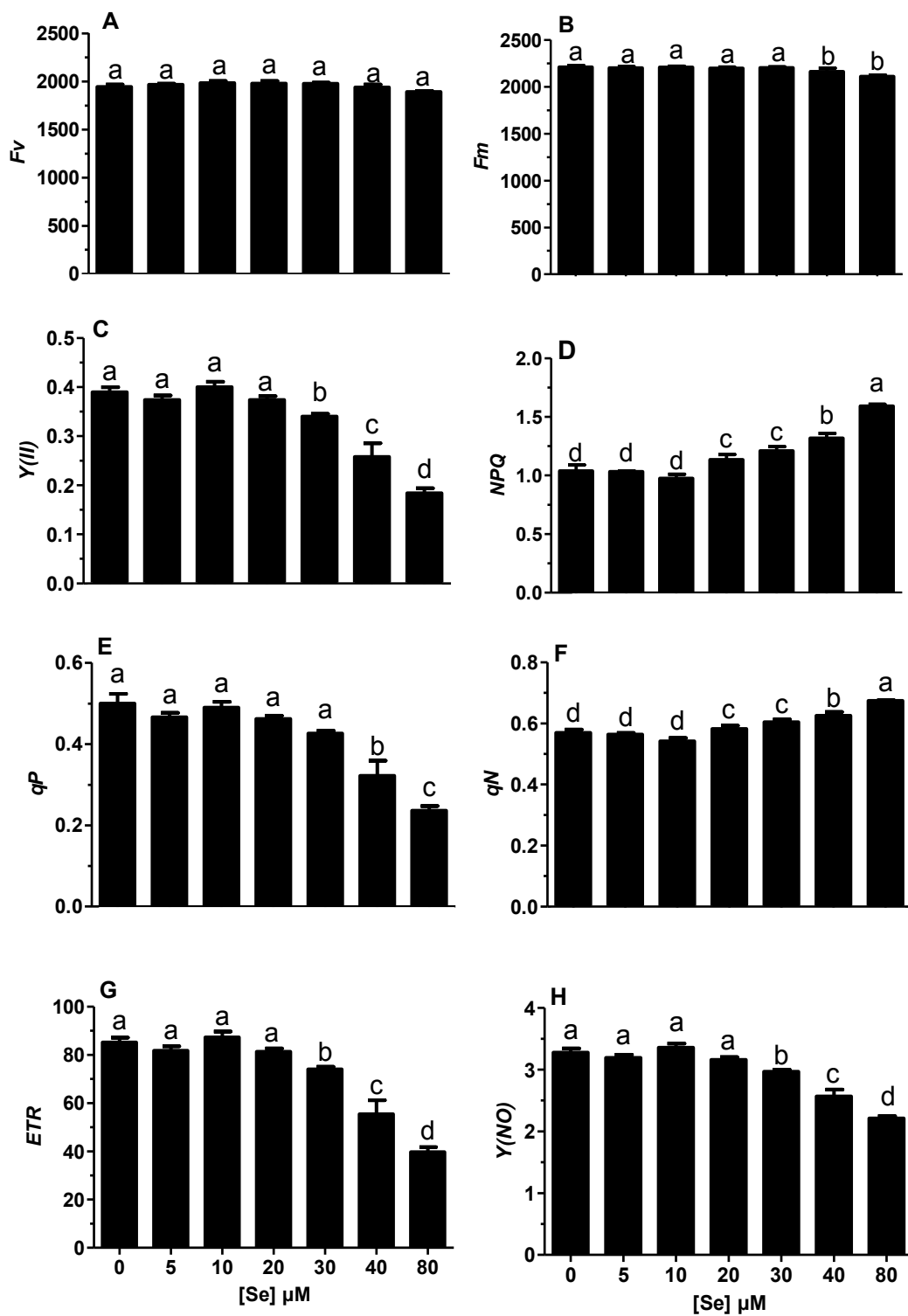


Figura 13. Efeitos de concentrações crescentes de Se sobre a fluorescência da clorofila *a* do cultivar de soja Embrapa 48 via solução nutritiva. Parâmetros: fluorescência variável (F_v) (A), fluorescência máxima (F_m) (B), rendimento quântico efetivo do fotossistema II [$Y(II)$] (C), *quenching* não-fotoquímico (NPQ) (D), *quenching* fotoquímico (qP) (E), *quenching* não-fotoquímico (qN) (F), taxa

de transporte de elétrons (*ETR*) (G) e rendimento das perdas não reguladas ($[Y(NO)]$) (H). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas resultantes do teste de *Scott-Knott* ($p < 0,05$). Dados são médias \pm erro padrão de cinco repetições.

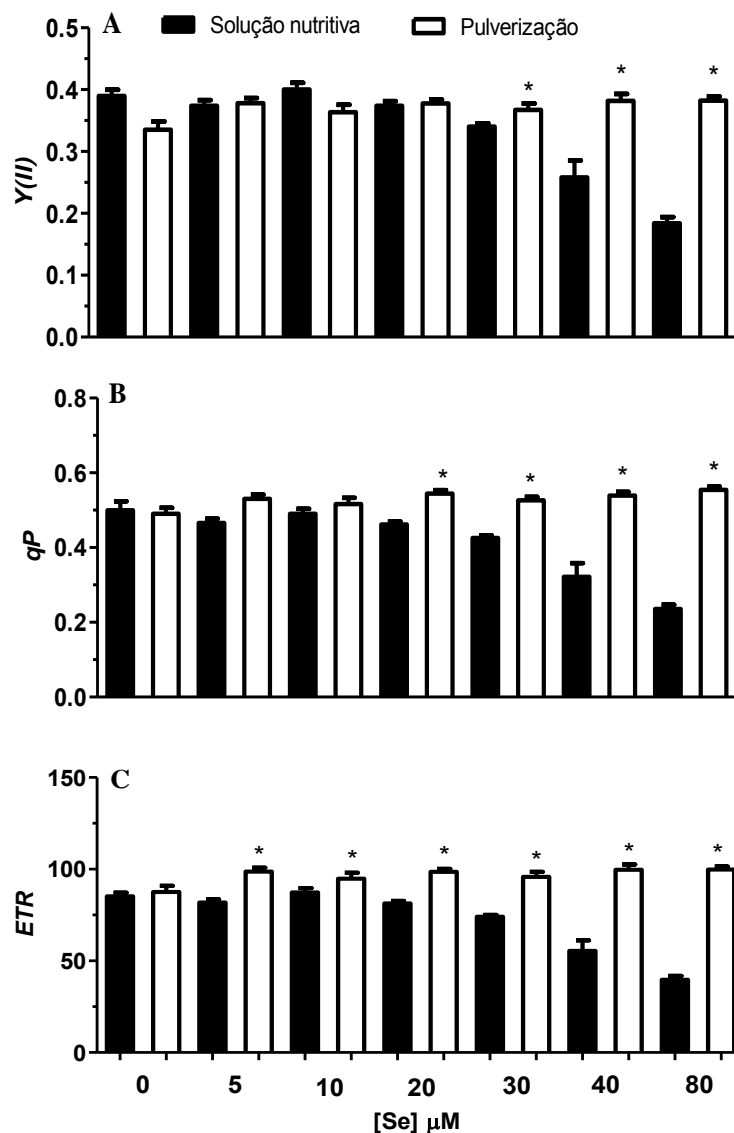


Figura 14. Efeitos da aplicação de diferentes concentrações de Se por meio de pulverização foliar e solução nutritiva sobre a fluorescência da clorofila *a*, do cultivar de soja Embrapa 48. Parâmetros: rendimento quântico efetivo $[Y(II)]$ (A), *quenching* fotoquímico (qP) (B) e taxa de transporte de elétrons (ETR) (C). * Indicam diferenças significativas entre os tratamentos resultantes do teste *t* ($p < 0,05$). Dados são médias \pm erro padrão de cinco repetições.

1.3.5 Caracterização anatômica da folha e do ápice da raiz das plantas de soja

As três técnicas de fornecimento de Se influenciaram a anatomia foliar e radicular das plantas de soja. De modo geral, a análise qualitativa demonstrou que as principais diferenças na organização dos tecidos do limbo e da região da nervura central foram verificadas nas plantas tratadas com 10 e 80 μM de Se, em relação às

plantas controle. A análise qualitativa do limbo das plantas tratadas via *priming*, revelou que o fornecimento de 10 μM favoreceu maior justaposição das células do parênquima paliçádico. Para o tratamento a 80 μM , observou-se maior justaposição das células do parênquima paliçádico, que também se apresentaram mais delgadas. Na região da nervura central, as células parenquimáticas apresentaram-se com tamanho irregular e paredes mais delgadas quando supridas com 10 μM , já a 80 μM essas células apresentaram maior tamanho, contorno regular e áreas de deposição de floema desorganizadas. Nas duas concentrações, as raízes das plantas apresentaram-se fortemente coradas com azul de toluidina, impossibilitando a distinção da área de cilindro central (Figura 15).

Na região do limbo das plantas pulverizadas, de forma geral, foram observadas células mais fortemente coradas. Além disso, constatou-se que as células do parênquima paliçádico sob a influência de 10 e 80 μM , apresentaram alterações em seu tamanho. Na região da nervura central, observaram-se muitas drusas, principalmente sob a influência de 10 e 80 μM . As raízes das plantas a 10 μM apresentaram-se intensamente coradas, apresentaram muitos núcleos e não foi possível realizar a diferenciação de tecidos, inclusive na região do cilindro central, já naquelas sob a influência com 80 μM de Se, observou-se maior diferenciação dos tecidos (Figura 16).

Para a região do limbo, a análise qualitativa das plantas tratadas com 10 μM de Se via solução nutritiva demonstrou aumento na espessura do mesófilo e do tamanho dos espaços intercelulares do parênquima esponjoso (Figura 17). O colapso das células da epiderme abaxial nas plantas tratadas com 80 μM de Se também foi constatado. Para a região da nervura central, observou-se que o floema se dispôs de forma desorganizada na concentração de 80 μM . Além disso, a 10 e a 80 μM constatou-se maior quantidade de células com conteúdo celular corado pelo azul de toluidina, tal fato também foi verificado para as raízes, que, também, apresentaram células da epiderme colapsadas a 80 μM , todas observações em relação aos controles (Figura 17).

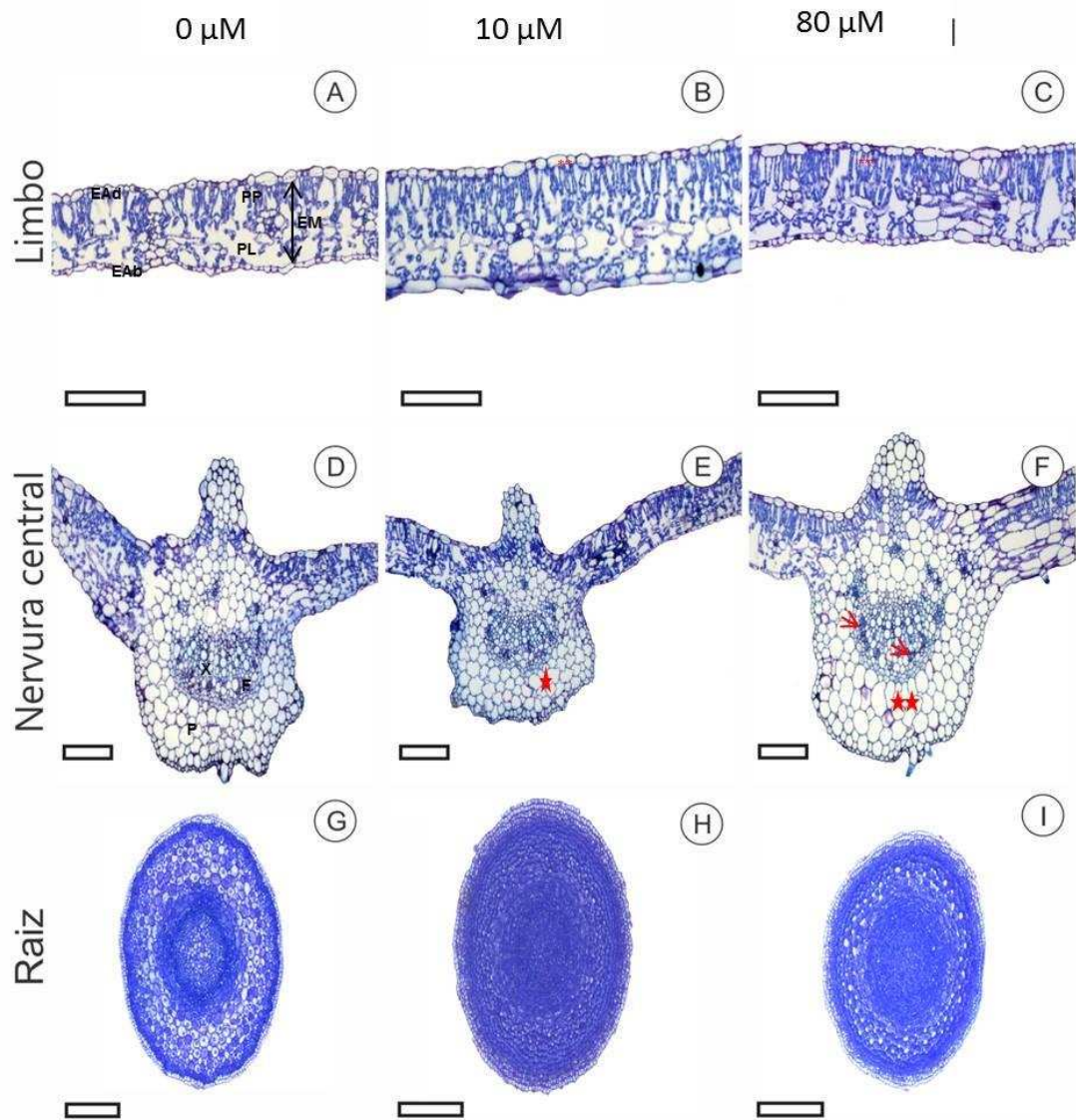


Figura 15. Efeitos da aplicação de diferentes concentrações de Se via *priming* sobre a anatomia foliar do cultivar de soja Embrapa 48. Barras: limbo e nervura central: 50 μm e raiz: 100 μm . Legenda: Ead: Epiderme adaxial, Eab: epiderme abaxial, PP: parênquima paliçádico, PL: parênquima lacunoso, EM: espessura do mesofilo, X: área de xilema, F: área de floema e P: parênquima de preenchimento.

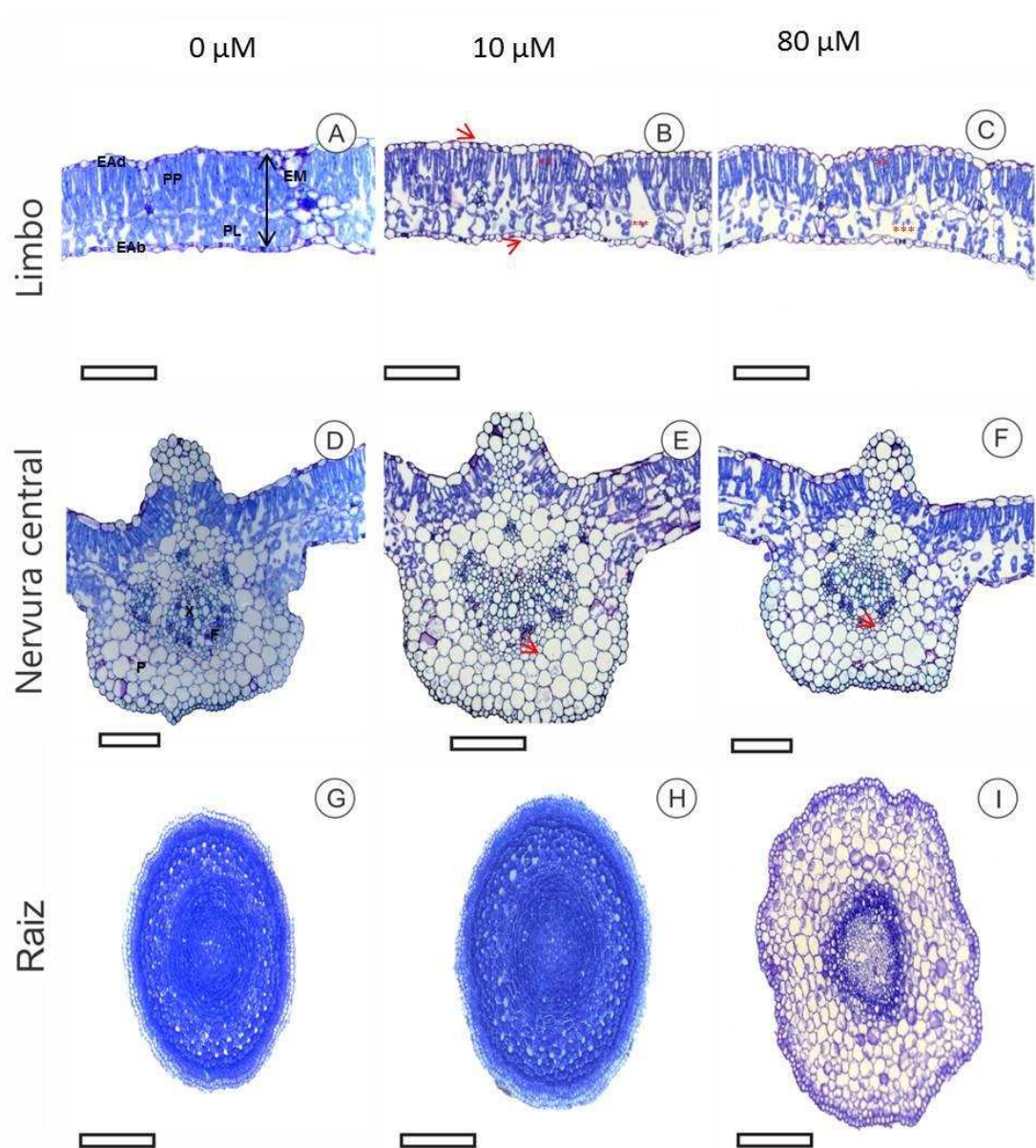


Figura 16. Efeitos da aplicação de diferentes concentrações de Se via pulverização, sobre a anatomia foliar e do ápice da raiz do cultivar de soja Embrapa 48. Barras e legenda: vide figura 15.

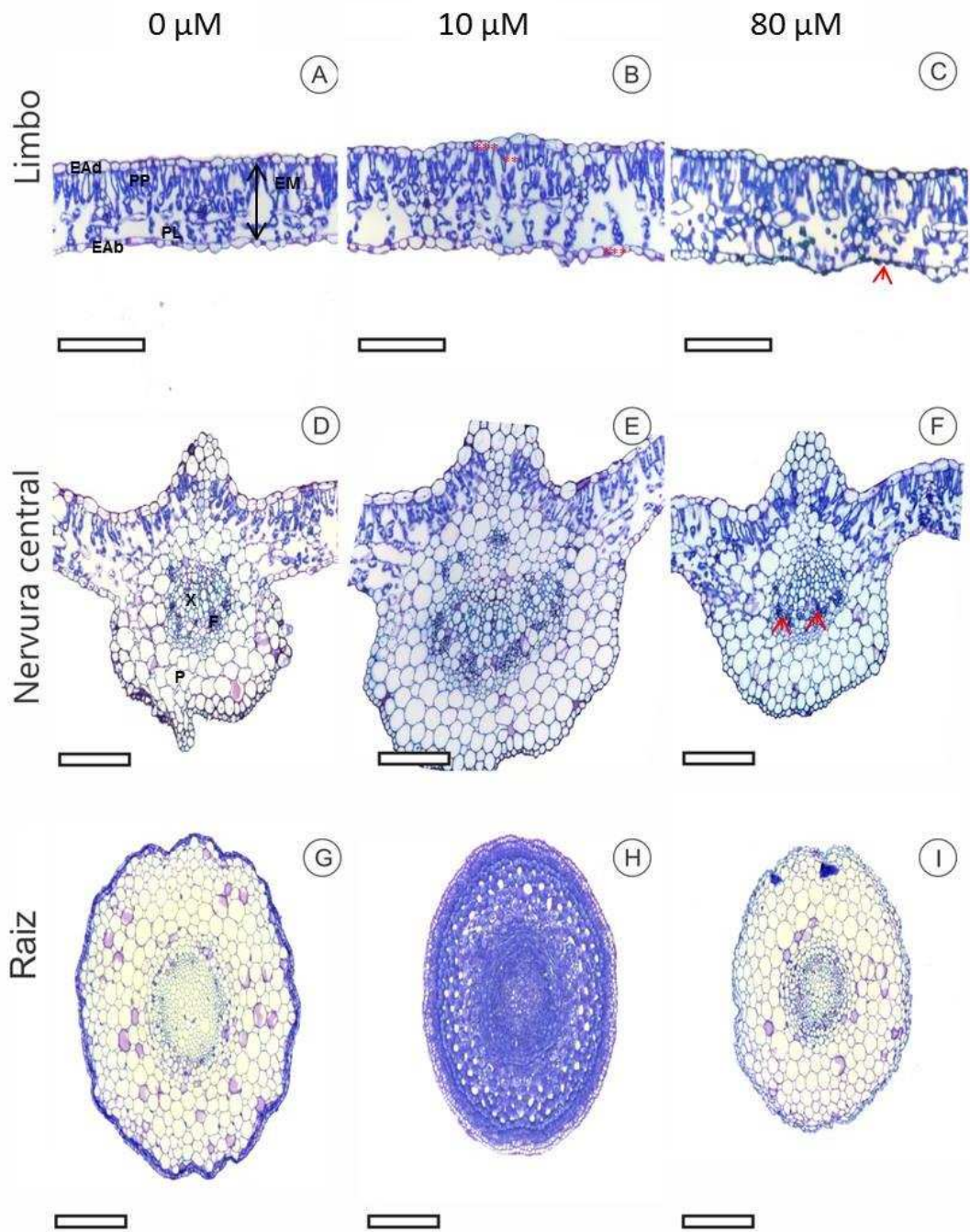


Figura 17. Efeitos da aplicação de diferentes concentrações de Se via solução nutritiva, sobre a anatomia foliar e do ápice da raiz do cultivar de soja Embrapa 48. Barras e legenda: vide figura 15.

A análise quantitativa evidenciou que o Se proporcionou efeitos à região do limbo das plantas, para os três modos de aplicação (Tabela 5), porém nenhuma diferença foi observada para a epiderme abaxial (*ANOVA*, $p > 0,05$). O fornecimento de 10 e 20 μM de Se aumentou a espessura do parênquima esponjoso e do mesofilo nas plantas supridas via *priming*; e da epiderme adaxial nas plantas pulverizadas com

Se a 5 e 10 μM . Semelhantemente, o Se, suplementado a 20 e 30 μM , também incrementou a espessura do parênquima esponjoso e do mesofilo nas plantas suplementadas via solução nutritiva.

Tabela 5. Análise quantitativa do limbo foliar em corte transversal do folíolo central da folha mais nova e totalmente expandida do cultivar de soja Embrapa 48 após exposição a concentrações crescentes de Se.

Forma de aplicação	[Se]	Epiderme adaxial (μm)	Parênquima esponjoso (μm)	Parênquima paliçádico (μm)	Espessura do mesofilo (μm)
Solução nutritiva	0	14,58 \pm 0,39 a	39,68 \pm 2,45 b	66,01 \pm 1,31 a	112,37 \pm 1,31 c
	5	12,14 \pm 0,64 a	52,12 \pm 3,39 a	61,80 \pm 1,73 a	114,65 \pm 2,29 b
	10	13,44 \pm 0,36 a	45,57 \pm 2,76 b	64,38 \pm 2,12 a	109,17 \pm 2,23 c
	20	14,01 \pm 0,81 a	57,58 \pm 2,41 a	72,47 \pm 1,06 a	128,89 \pm 1,98 a
	30	14,45 \pm 0,92 a	54,03 \pm 2,86 a	70,61 \pm 4,87 a	125,39 \pm 3,39 a
	40	14,27 \pm 0,55 a	50,70 \pm 1,79 a	69,03 \pm 3,51 a	117,98 \pm 1,83 b
	80	13,56 \pm 0,72 a	44,15 \pm 3,60 b	64,77 \pm 2,78 a	109,65 \pm 2,32 c
Priming	0	15,13 \pm 0,68 a	53,11 \pm 2,18 b	73,89 \pm 2,94 a	124,13 \pm 4,91 b
	5	14,51 \pm 0,41 a	54,83 \pm 4,28 b	71,11 \pm 2,55 a	123,97 \pm 6,23 b
	10	15,81 \pm 0,36 a	69,58 \pm 6,03 a	79,85 \pm 3,36 a	148,74 \pm 8,51 a
	20	16,28 \pm 0,60 a	67,36 \pm 2,28 a	78,60 \pm 0,92 a	143,60 \pm 2,88 a
	30	15,87 \pm 0,61 a	56,27 \pm 3,23 b	72,34 \pm 2,54 a	126,18 \pm 4,95 b
	40	14,61 \pm 0,40 a	57,50 \pm 4,50 b	83,26 \pm 6,02 a	121,29 \pm 9,31 b
	80	15,56 \pm 0,54 a	58,42 \pm 2,19 b	77,19 \pm 2,06 a	134,63 \pm 3,22 a
Pulverização	0	11,84 \pm 0,37 b	54,25 \pm 1,02 a	82,81 \pm 1,56 a	135,21 \pm 2,11 a
	5	15,04 \pm 0,51 a	57,21 \pm 2,30 a	80,00 \pm 1,52 a	133,65 \pm 3,16 a
	10	14,64 \pm 0,45 a	59,26 \pm 1,62 a	79,21 \pm 1,58 a	137,68 \pm 2,18 a
	20	12,25 \pm 0,44 b	52,43 \pm 1,50 a	79,83 \pm 1,66 a	130,76 \pm 1,87 a
	30	12,67 \pm 0,37 b	54,10 \pm 1,84 a	75,15 \pm 1,26 a	128,23 \pm 2,01 a
	40	12,51 \pm 0,36 b	56,88 \pm 4,05 a	77,96 \pm 1,92 a	135,66 \pm 4,01 a
	80	12,78 \pm 0,27 b	53,63 \pm 1,20 a	79,50 \pm 1,22 a	132,82 \pm 1,44 a

Médias \pm erro padrão da média, seguidas pela mesma letra, não diferem estatisticamente pelo teste de *Scott-Knott* a 5 % de probabilidade. Dados são médias \pm erro padrão de três repetições, com cinco subrepetições, por tratamento.

Efeitos foram verificados sobre os tecidos da região da nervura central, principalmente, a partir de 20 μM , nas plantas suplementadas com Se via *priming*, e, a partir de 40 μM , naquelas suplementadas via pulverização (Tabela 6). Nenhum efeito foi observado para a área da secção transversal total das raízes, para os três experimentos (*Anova*; $p > 0,05$).

Tabela 6. Áreas de secção transversal da região da nervura central do folíolo central da folha mais nova e totalmente expandida, do cultivar de soja Embrapa 48, após exposição a concentrações crescentes de Se.

Forma de aplicação	[Se]	Área de secção transversal de feixe vascular (mm ²)	Área de secção transversal de xilema (mm ²)	Área de secção transversal de floema (mm ²)
Solução nutritiva*	0	0,057 ± 0,018	0,022 ± 0,007	0,035 ± 0,011
	5	0,068 ± 0,007	0,028 ± 0,003	0,040 ± 0,004
	10	0,087 ± 0,004	0,035 ± 0,002	0,052 ± 0,002
	20	0,093 ± 0,014	0,036 ± 0,005	0,056 ± 0,009
	30	0,074 ± 0,011	0,026 ± 0,004	0,048 ± 0,007
	40	0,085 ± 0,007	0,031 ± 0,003	0,054 ± 0,005
	80	0,058 ± 0,012	0,024 ± 0,005	0,033 ± 0,007
Priming	0	0,109 ± 0,004 a	0,042 ± 0,001 a	0,067 ± 0,003 a
	5	0,064 ± 0,012 b	0,024 ± 0,005 b	0,039 ± 0,007 b
	10	0,093 ± 0,016 a	0,039 ± 0,008 a	0,053 ± 0,008 a
	20	0,055 ± 0,005 b	0,022 ± 0,002 b	0,033 ± 0,003 b
	30	0,025 ± 0,003 c	0,011 ± 0,002 b	0,014 ± 0,001 c
	40	0,049 ± 0,011 b	0,020 ± 0,005 b	0,029 ± 0,007 b
	80	0,036 ± 0,004 c	0,015 ± 0,002 b	0,021 ± 0,002 c
Pulverização	0	0,082 ± 0,008 a	0,034 ± 0,004 a	0,048 ± 0,005 a
	5	0,089 ± 0,003 a	0,035 ± 0,001 a	0,055 ± 0,003 a
	10	0,057 ± 0,012 b	0,025 ± 0,005 a	0,032 ± 0,007 b
	20	0,053 ± 0,015 b	0,019 ± 0,004 b	0,033 ± 0,011 b
	30	0,066 ± 0,007 a	0,028 ± 0,003 a	0,038 ± 0,004 b
	40	0,035 ± 0,010 b	0,016 ± 0,004 b	0,019 ± 0,006 b
	80	0,034 ± 0,001 b	0,014 ± 0,000 b	0,020 ± 0,001 b

* Sem diferenças significativas (*Anova*; $p > 0,05$)

Médias ± erro padrão da média, seguidas pela mesma letra, não diferem estatisticamente pelo teste de *Scott-Knott* a 5 % de probabilidade. Dados são médias ± erro padrão de três repetições, com cinco sub-repetições por tratamento.

1.4 Discussão

De forma geral, a capacidade de absorção de Se, o acúmulo de biomassa pelas plantas, as taxas de translocação e a frequência de exposição foram os fatores decisivos para a acumulação do Se em soja, para os três modos de aplicação. Tais fatores estiveram diretamente relacionados com os efeitos que foram desencadeados pelo Se nas plantas. Nesse sentido, o aumento nas concentrações de Se nas plântulas com *priming* a 30 e 80 µM evidenciou a sua absorção de forma proporcional às concentrações fornecidas. Já a redução do Se nas folhas das plantas tratadas com 80

μM via *priming*, evidenciou que o acúmulo de biomassa pelas folhas desencadeou a diluição interna do Se (Tinker, 1981). Tal processo é considerado para vários elementos químicos, como mercúrio (Hg) (Ferrat et al., 2003; Lafabrie et al., 2011), arsênio (As) (Lafabrie et al., 2011), cádmio (Cd) e chumbo (Pb) (Song et al., 2013).

As alterações morfológicas nas plantas tratadas com *priming* e via solução nutritiva podem ter sido originadas do estresse oxidativo desencadeado pelo acúmulo de Se nos tecidos (Gupta e Gupta, 2017; Mostofa et al., 2017). Tal acúmulo foi proporcional à concentração de Se aplicada e dependeu da frequência de exposição das plantas e da sua taxa de absorção e translocação, em resposta ao fluxo evapotranspiratório (Tinker, 1981; Hawrilak-Nowak et al., 2015). Em contrapartida, as alterações na morfologia das plantas tratadas com $80 \mu\text{M}$ via pulverização resultaram da atividade antioxidante induzida pelo Se (Pilon-Smits et al., 2009) que foi restrita ao local de aplicação, devido ao seu maior acúmulo nesse local e, tendo em vista que, efeitos não foram observados sobre as raízes das sojas pulverizadas.

Um dos aspectos positivos do fornecimento de Se via pulverização foram os incrementos no alongamento relativo da parte aérea das plantas no 1° e 10° DAE. Soma-se a ele, o aumento no alongamento relativo da raiz principal nas plantas supridas com Se via solução nutritiva, no 10° DAE. Esses incrementos podem ser um efeito do Se sobre as concentrações de Ca (Nawaz et al., 2015) e estão de acordo com a influência do Se sobre os níveis de nutrientes (Ribeiro et al., 2016).

De forma geral, a baixa frequência de exposição associada ao consequente menor acúmulo de Se nas plantas pulverizadas com $80 \mu\text{M}$, podem ter potencializado o efeito antioxidativo do Se de forma direta (Pilon-Smits et al., 2009; Moulick et al., 2016) e indireta (Brown e Shrift, 1982; Schiavon e Pilon-Smits, 2017). Nesse sentido, corroboraram os incrementos observados sobre $Y(II)$, qP e ETR , ao indicarem que, as plantas pulverizadas apresentaram maior capacidade fotossintética, quando comparadas às plantas controles e não refletiram danos causados por excesso de Se sobre os fotossistemas (Zhang et al., 2014), conforme pode ser subsidiado pela ausência de alterações na região do limbo foliar das plantas pulverizadas, exceto pelo aumento na espessura da epiderme adaxial nas plantas pulverizadas com 5 e $10 \mu\text{M}$ sugerindo um papel importante do Se na redução da transpiração.

O aumento na espessura do parênquima esponjoso e do mesófilo, nas plantas suplementadas com 20 e $30 \mu\text{M}$ de Se via solução nutritiva, pode ser considerado, como um mecanismo de tolerância ao Se (Pereira et al., 2011). Nesse sentido, é

possível que o aumento na espessura do parênquima esponjoso e do mesofilo em soja, tenha sido desencadeado como uma resposta de tolerância ao excesso de Se. Essa resposta foi previamente constatada por Grisi et al., (2008), quando verificaram maior espessura do parênquima esponjoso, em resposta à tolerância ao estresse por déficit hídrico em café e por Pereira et al., (2014), quando verificaram maior espessura do mesofilo, em resposta ao estresse por Pb em *Eichornia*. Dessa forma, é possível que o tratamento com Se tenha favorecido o armazenamento de CO₂, tendo em vista que esta é uma das funções do parênquima esponjoso (Castanheira et al., 2016) e do mesofilo (Pereira et al., 2014). O fornecimento de Se também aumentou a espessura do parênquima esponjoso nas plantas supridas com 10 e 20 µM de Se via *priming*, porém sem exercer influência sobre mecanismos fisiológicos das plantas.

De forma geral, os resultados evidenciaram que o fornecimento de Se, via solução nutritiva limitou o crescimento das plantas, conforme corroboraram as reduções observadas para a razão parte aérea/raiz, taxa de crescimento relativo da parte aérea, taxa fotossintética e acúmulo de biomassa total. Para esse tratamento, as plantas tiveram o tempo de exposição como fator determinante para as reduções. Elas podem ter ocorrido devido à perda da função estomática, conforme evidenciou a menor *E* dessas plantas, indicando possível estratégia para evitar o acúmulo de Se nos tecidos, já que elas implicam reduções da absorção de Se, por meio das raízes (Tinker, 1981). De forma geral, reduções em *Fv*, *qP*, *Y(II)*, *ETR* e *Y(NO)* e incrementos em *qN* e *NPQ* foram evidências de supressão do aparato fotossintético e de possíveis danos ao fotossistema II das plantas suplementadas nas maiores concentrações de Se via solução nutritiva. Essas reduções estão em conformidade com as concentrações de Se das plantas de soja tratadas via solução nutritiva.

Em suma, um efeito duplo do tratamento com Se foi observado sobre as plantas de soja tratadas por meio da pulverização foliar e via solução nutritiva a 80 µM. Tal efeito esteve em função do acúmulo de Se nos tecidos que, por sua vez, foi dependente do modo de aplicação e tempo de exposição para a indução de efeitos sobre a morfologia, o crescimento, a fisiologia e a anatomia das plantas. Assim, pode-se afirmar que, quando aplicado via pulverização, o Se atuou de forma positiva, pois acumulou localmente e, portanto, ativou pontualmente processos bioquímicos celulares que culminaram em efeitos pontuais e positivos sobre as trocas gasosas e a fluorescência da clorofila *a* (Feng et al., 2015; Nawaz et al., 2015). No entanto, o Se atuou em níveis considerados tóxicos sobre a morfologia, o crescimento, a fisiologia

e a anatomia do limbo das plantas a 80 μM , quando fornecido via solução nutritiva, uma vez que o acúmulo de Se foi proporcional à concentração de Se na solução.

1.5 Conclusões

Ao acúmulo de Se nos tecidos, estão associadas alterações fisiológicas e morfo-anatômicas que foram observadas nas plantas para os três modos de aplicação. Dentre eles, o fornecimento de Se via *priming* foi responsável apenas por modificações morfo-anatômicas, enquanto o fornecimento de Se via pulverização desencadeou, principalmente, incrementos nas trocas gasosas das plantas, sem exercer efeitos sobre o crescimento. Por sua vez, o fornecimento de Se via solução nutritiva reduziu as trocas gasosas e, conseqüentemente, o crescimento das plantas; dessa forma, induzindo toxicidade.

Com base no exposto, pode-se dizer que, dentre os três modos de aplicação, o fornecimento de Se via pulverização foi o ideal, por induzir modificações favoráveis sobre alguns aspectos fisiológicos das plantas. Nesse sentido, das seis concentrações de Se testadas via pulverização, 80 μM foi a que se destacou, como a responsável pelas alterações fisiológicas de maior potencial à indução de tolerância das plantas ao déficit hídrico. Sendo assim, em estudos futuros, recomenda-se pulverizar plantas de soja com 80 μM , a fim de investigar maiores efeitos de tal tratamento.

1.6 Referências

Ardebili NO, Saadatmand S, Niknam V, Khavari-Nejad RA (2014) The alleviating effects of selenium and salicylic acid in salinity exposed soybean. **Acta Physiol Plant** 36:3199-3205

APG 4 (2016) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Bot J Linn Soc** 181:1-20

Brown TA, Shrift A (1982) "Selenium: Toxicity and tolerance in higher plants" **Biological Review** 57:59-84

Castanheira DT, Rezende TT, Baliza DP, Guedes JM, Carvalho SP, Guimarães RJ, Viana MTR (2016) Potencial de utilização de características anatômicas e fisiológicas na seleção de progênies de cafeeiro. **Coffee Sci** 11: 375-386

Chauhan R, Awasthi S, Tripathi P, Mishra S, Dwivedi S, Niranjana A, Mallick S, Tripathi P, Pande V, Tripathi RD (2017) Selenite modulates the level of phenolics and nutrient element to alleviate the toxicity of arsenite in rice (*Oryza sativa* L.) **Ecotoxicol Environ Saf** 138:47-55

Chen L, Yang F, Xu J, Hu Y, Hu Q, Zhang Y (2002) Determination of selenium concentration of rice in China and effect of fertilisation of selenite and selenate on selenium content of rice. **J Agric Food Chem** 50:5128-5130

Clark J (1975) Agriculture. **Food Chem** 23:458-460

Djanaguiraman M, Devi, DD, Shanker AK, Sheeba JÁ, Bangarusamy U (2005) Selenium - an antioxidative protectant in soybean during senescence. **Plant Soil** 272:77-86

Eurola M, Ekholm P, Ylinen M, Koivistoinen P, Varo P (1990) Effects of selenium on the selenium content of cereal grains, flour, and bread produced in Finland. **Cereal Chem** 67:334-337

Ellis DR, Sors TG, Brunk DG, Albrecht C, Orser C, Lahner B, Wood KV, Harris HH, Pickering IJ, Salt DE (2004) Production of Se-methylselenocysteine in transgenic plants expressing selenocysteine methyltransferase. **BMC Plant Biol** 4:1-11

Feng T, Chen SS, Gao DQ, Liu GQ, Bai HX, Li A, Peng LX, Ren ZY (2015) Selenium improves photosynthesis and protects photosystem II in pear (*Pyrus bretschneideri*), grape (*Vitis vinifera*), and peach (*Prunus persica*). **Photosynthetica** 53:609-612

Ferrat L, M. Gnassia-Barelli M, Pergent-Martini C, Roméo M (2003) Mercury and non-protein thiol compounds in the seagrass *Posidonia oceanica*. **Comp Biochem Physiol** 134:147-155

Fordyce FM (2013) Selenium deficiency and toxicity in the Environment. In: Selinus O. (eds) **Essentials of Medical Geology** Springer, Dordrecht 375-416

Golob A, Kavcic J, Stibilj V, Gaberscik A, Vogel-Mikus, K, Germ M (2017) The effect of selenium and UV radiation on leaf traits and biomass production in *Triticum aestivum* L. **Ecotoxicol Environ Saf** 136:142-149

Grisi FA, Alves JD, Castro EM, Oliveira C, Melo LA (2008) Avaliações anatômicas foliares em mudas de café ‘Catuaí’ e ‘Siriema’ submetidas ao estresse hídrico. **Ci Agrotecnol** 36:1730-1736

Gupta M, Gupta S (2017) An overview of selenium uptake, metabolism, and toxicity in plants. **Front Plant Sci** 2074:1-14

Hawrylak-Nowak B, Matraszek R, Pogorzelec M (2015) The dual effects of two inorganic selenium forms on the growth, selected physiological parameters and macronutrients accumulation in cucumber plants. **Acta Physiol Plant** 37:41

Hu J, Zhao Q, Cheng X, Selomutya C, Bai C, Zhu X, Li X, Xiong H (2014) Antioxidant activities of Se-SPI produced from soybean as accumulation and biotransformation reactor of natural selenium. **Food Chem** 146:531-537

Hunt R (1978) Plant growth analysis. Studies in biology series No. 96. **Edward Arnold Ltd.**, London, U.K. 57p

Iqbal M, Hussain I, Liaqat H, Ashraf MA, Rasheed R, Rehman AU (2015) Exogenously applied selenium reduces oxidative stress and induces heat tolerance in spring wheat. **Plant Physiol Biochem** 94:95–103

Katharia S, Baghel L (2016) Influence of UV exclusion and selenium on carbon fixation, nitrogen fixation and yield of soybean variety JS-335. **S Afr J Bot** 103:126-134

Kaur S, Nayyar, H (2015) Selenium fertilization to salt-stressed mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) plants reduces sodium uptake, improves reproductive function, pod set and seed yield. **Sci Horti** 197:304-317

Lafabrie C, Major KM, Major CS, Cebrián J (2011). Arsenic and mercury bioaccumulation in the aquatic plant, *Vallisneria neotropicalis* **Chemosphere** 82:1393-1400

Lehotai N, Kolbert Z, Peto A, Feigl G, Ordog A, Kumar D, Tari I, Erdei L. (2012) Selenite-induced hormonal and signalling mechanisms during root growth of *Arabidopsis thaliana* L. **J Exp Bot** 63:5677-5687

Liu XH, Gao YT, Sardar K, Duan G, Chen AK, Ling L, Zao L, Zhonghan L, Xuecan W (2008) Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on contaminated sites and their potential accumulation capacity in Heqing, Yunnan. **J Environ Sci** 20:1469-1474

Maihara VA, Gonzaga IB, Silva VL, Fávaro DIT, Vasconcelos MBA, Cozzolino SMF (2004) Daily dietary selenium intake of selected brazilian population groups. **J Radioanal Nucl Chem** 259:465-468

Mostofa MG, Hossain MA, Siddiqui MN, Fujita M, Tran L-SP (2017) Phenotypical, physiological and biochemical analyses provide insight into selenium-induced phytotoxicity in rice plants. **Chemosphere** 178:212-223

Moulick D, Ghosh D, Santra SC (2016) Evaluation of effectiveness of seed priming with selenium in rice during germination under arsenic stress. **Plant Physiol Biochem** 109:571-578

Nawaz F, Ahmad R, Ashraf MY, Waraich EA, Khan SZ (2015) Effect of selenium foliar spray on physiological and biochemical processes and chemical constituents of wheat under drought stress. **Ecotoxicol Environ Safety** 113:191-200

Nawaz F, Naeem M, Ashraf MY, Tahir MN, Zulfigar B, Salahuddin M, Shabbir RN, Aslam M (2016) Selenium supplementation affects physiological and biochemical processes to improve fodder yield and quality of maize (*Zea mays* L.) under water deficit conditions. **Front Plant Sci** 7:1-13

O'Brien TP, Feder N, McCully ME (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **Protoplasma** 59:368-373

Pereira FJ, Castro EM, Oliveira C, Pires MF, Pasqual M (2011) Mecanismos anatômicos e fisiológicos de plantas de aguapé para a tolerância à contaminação por arsênio. **Planta Daninha** 29:259-267

Pereira FJ, Castro EM, Oliveira C, Pires MF, Pereira MP, Ramos SJ, Faquin V (2014) Lead tolerance of water hyacinth (*Eichornia crassipes* Mart. - Pontederiaceae) as defined by anatomical and physiological traits. **An Acad Bras Cienc** 86:1423-1433

Pilon-Smits EA, Quinn CF, Tapken W, Malagoli M, Schiavon M (2009) Physiological functions of beneficial elements. **Curr Opin Plant Biol** 12:267-274

Ribeiro DM, Júnior DDS, Cardoso FB, Martins AO, Silva WA, Nascimento VL, Araújo WL (2016) Growth inhibition by selenium is associated with changes in primary metabolism and nutrient levels in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Environ** 39:2235-2246

Schiavon M, Pilon-Smits EAH (2017) The fascinating facets of plant selenium accumulation - biochemistry, physiology, evolution and ecology. **New Phytol** 213:1582-1596

Shi X, Zhang X, Chen G, Chen Y, Wang L, Shan X (2011) Seedling growth and metal accumulation of selected woody species in copper and lead/zinc mine tailings. **J Environ Sci** 23:266-274

Song N, Wang F, Zhang C, Tang S, Guo J, Ju X, Smith DL (2013) Fungal inoculation and elevated CO₂ mediate growth of *Lolium mutiforum* and *Phytolacca americana*, metal uptake, and metal bioavailability in metal-contaminated soil: evidence from DGT measurement. **Int J Phytoremediation** 15:268-282

Souza SCR, Andrade SAL, Souza LA, Schiavinato MA (2012) Lead tolerance and phytoremediation potential of brazilian leguminous tree species at the seedling stage. **J Environ Manag** 110:299-307

Tinker PB (1981) Levels, distribution and chemical forms of trace elements in food plants. **Philos Tr Soc B** 294:41-55

Yusuf M, Tanveer AK, Fariduddin Q (2016) Interaction of epibrassinolide and selenium ameliorates the excess copper in *Brassica juncea* through altered proline metabolism and antioxidants. **Ecotoxicol Environ Saf** 129:25-34

Zhang M, Tang S, Huang X, Zhang F, Pang Y, Huang Q, Yi Q (2014) Selenium uptake, dynamic changes in selenium content and its influence on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in rice (*Oryza sativa* L.). **Environ Exp Bot** 107:39-45

CAPÍTULO 2

Efeitos do tratamento com selenato de sódio em plantas de soja [(*Glycine max* L.) Merrill] sob déficit hídrico, induzido pelo tratamento com polietilenoglicol (PEG 6000)

Resumo: O fornecimento de selênio (Se), previamente a uma condição de déficit hídrico, tem sido reconhecido como benéfico, pelo fato de atenuar os efeitos desse estresse em plantas de diferentes espécies. Nesse sentido, dentre as espécies cultivadas, não existem evidências dos efeitos benéficos do tratamento com Se em soja, uma espécie que apresenta grandes perdas em sua produtividade, em consequência da escassez hídrica. Dessa forma o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos da pulverização foliar de 80 μM de Se, na forma de selenato de sódio (Na_2SeO_4), em plantas de soja, cultivadas em câmara de crescimento de plantas sob condições controladas, no estágio V_3 - V_4 , submetidas ao déficit hídrico induzido pelo tratamento com polietilenoglicol (PEG 6000) via solução nutritiva de Clark. A pulverização incrementou o parênquima esponjoso, reduziu a área da secção transversal total da raiz, alterou níveis de cálcio (Ca) e potássio (K), aumentou o teor de ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e a atividade da enzima peroxidase (POX) nas plantas submetidas ao déficit hídrico a -0,1 MPa. Já nas plantas sob déficit hídrico a -0,4 MPa, a pulverização reduziu a área foliar, aumentou o teor relativo de água foliar, beneficiou parâmetros de fluorescência da clorofila *a*, incrementou a epiderme adaxial, o teor de clorofilas *a* e reduziu o teor de peróxido de hidrogênio e glicose nas raízes. Essas alterações demonstraram que o cultivar de soja EMBRAPA 48 recorreu ao efeito antioxidante do Se para induzir proteção ao déficit hídrico. Devido a inexpressiva atividade das principais enzimas do sistema antioxidativo, não foi possível esclarecer os mecanismos bioquímicos envolvidos nessas respostas. É possível que o tempo de exposição das plantas ao PEG tenha sido excessivo, suprimindo, assim, seu sistema antioxidativo enzimático.

Palavras-chaves: alterações bioquímicas; estresse; fluorescência da clorofila *a*; morfologia; selênio.

**Effects of treatment with sodium selenate in soybean plants [(*Glycine max* L.)
Merril] under water deficit, induced by treatment with polyethyleneglycol (PEG
6000)**

Abstract: The supply of selenium (Se), previously to a condition of water deficit, has been recognized as beneficial, since it attenuates the effects of this stress in plants of different species. In this sense, among the cultivated species, there is no evidence of the beneficial effects of the treatment with Se in soybean, a species that presents great losses in its productivity, as a consequence of the water scarcity. The objective of this work was to evaluate the effects of foliar spraying of 80 μM Se, in the form of sodium selenate (Na_2SeO_4), in soybean plants, cultivated in a chamber of growth of plants under controlled conditions in the V_3 - V_4 stage, submitted to the water deficit induced by the treatment with polyethyleneglycol (PEG 6000) via Clark nutrient solution. The spray increased the spongy parenchyma, reduced the total cross-sectional area of the root, altered calcium (Ca) and potassium (K) levels, increased superoxide anion content ($\text{O}_2^{\cdot-}$) and peroxidase (POX) in the plants submitted to the water deficit at -0.1 MPa. In the plants under water deficit at -0.4 MPa, the spray reduced leaf area, increased leaf water content, benefited chlorophyll *a* fluorescence parameters, increased the upper epidermis, chlorophyll *a* content and reduced the content of hydrogen peroxide and glucose in the roots. These changes demonstrated that the soybean cultivar EMBRAPA 48 resorted to the antioxidant effect of Se to induce protection to the water deficit. Due to the inexpressive activity of the main enzymes of the antioxidative system, it was not possible to clarify the biochemical mechanisms involved in these responses. Is possible that the time of exposure of the plants to the PEG was excessive, thus suppressing the enzymatic antioxidative system of the plants.

Keywords: biochemical changes; stress; chlorophyll *a* fluorescence; morphology; selenium.

2.1 Introdução

O selênio (Se) é um elemento benéfico às plantas principalmente devido à sua função antioxidante (Djanaguiramann et al., 2005; Germ et al., 2007; Pilon-Smits et al., 2009; Kaur e Nayyar, 2015; Nawaz et al., 2015; Moulick et al., 2016; Nawaz et

al., 2016; Mroczek-Zdyrska et al., 2017). Dependendo do tempo de exposição e do modo de aplicação, este elemento pode influenciar vários processos fisiológicos, desde a germinação à reprodução, de diferentes espécies vegetais (Longchamp et al., 2015; Hussain et al., 2016; Nawaz et al., 2016).

Existem vários modos de fornecimento de Se às plantas. Todos eles têm demonstrado eficácia sobre vários componentes do crescimento e da produtividade, em condições ambientais ótimas e de estresse. Dentre eles, a pulverização foliar é uma alternativa viável para enriquecer produtos agrícolas com Se, facilitar seu transporte através do xilema e do floema, favorecer a manutenção do turgor celular e as trocas gasosas (Nawaz et al., 2015). A respeito das condições de estresse, em particular àquelas relacionadas ao déficit hídrico, sabe-se que o tratamento com Se tem proporcionado benefícios a plantas de trigo (Kuznetsov et al., 2003; Tadina et al., 2007; Yao et al., 2009; Nawaz et al., 2013; Hajiboland et al., 2014 e Nawaz et al., 2015), milho (Sajedi et al., 2011; Nawaz et al., 2016), batata (Germ et al., 2007), trevo (Wang et al., 2011) e cevada (Habibi, 2013).

Diversos estudos apontam um grande intervalo de concentrações, formas químicas e modos de aplicação de Se, todos eles, na maioria das vezes, desencadeadores de efeitos benéficos sobre a regulação do *status* hídrico, em plantas sob déficit hídrico, por meio da regulação de parâmetros fotossintéticos (Kuznetsov et al., 2003; Germ et al., 2007; Proietti et al., 2013; Hajiboland et al., 2014), do sistema antioxidativo enzimático e não-enzimático (Yao et al., 2009; Sajedi et al., 2011; Habibi, 2013; Nawaz et al., 2016) e do acúmulo de osmólitos (Nawaz et al., 2013; Hajiboland et al., 2014; Nawaz et al., 2016), com efeitos positivos sobre o crescimento (Yao et al., 2009; Habibi, 2013; Nawaz et al., 2013; Nawaz et al., 2015).

O déficit hídrico se destaca, atualmente, como o principal fenômeno que contribui para a perda de produtividade em espécies cultivadas. De forma geral, a maioria dos estudos sobre déficit hídrico evidenciam como as plantas se ajustam osmoticamente (Blum, 2016), como o estresse oxidativo é induzido (Maraghni et al., 2014; Karami et al., 2016) e como ocorre a organização dos estômatos (Makbull et al., 2011), mas pouca atenção tem sido dada às mudanças que ocorrem nas raízes das plantas. Dentre os motivos, destaca-se a dificuldade em estudá-las quando as plantas são cultivadas no solo. Nesse sentido, surgiram as pesquisas com polietilenoglicol (PEG) que é um composto não penetrante, não iônico, quimicamente inerte e com alto peso molecular. Suas grandes moléculas desfavorecem a plasmólise (Walker e

Parrot, 2001), o que possibilita a simulação do déficit hídrico em plantas, através da indução de estresse osmótico (Ji et al., 2014).

Dentre as espécies cultivadas, a soja (*Glycine max* L.) destaca-se como uma importante *commodity* no mercado nacional e internacional e, pelo fato de vários tipos de estresses abióticos, a exemplo do déficit hídrico, prejudicarem a sua qualidade. Nesse sentido, várias pesquisas vêm sendo realizadas com o intuito de atenuar os efeitos decorrentes do déficit hídrico sobre esta espécie. No entanto, até o presente momento, não há estudos que relatem como ocorrem as alterações fisiológicas e morfo-anatômicas induzidas pelo Se em plantas de soja sob déficit hídrico. Porém, sugere-se que ele induza efeitos semelhantes aos desencadeados em trigo, milho, batata, trevo e cevada, como a melhora da fotossíntese e a manutenção do status hídrico (Hajiboland et al., 2014), a redução do estresse oxidativo (Hussain et al., 2016) e os incrementos nos teores de clorofilas (Nawaz et al., 2016).

Com base no exposto, é possível inferir que, a aplicação de uma concentração de Se indutora de efeitos benéficos em soja pode favorecer incrementos na fotossíntese e mudanças morfo-anatômicas e bioquímicas benéficas, com potencial para sustentar a tolerância dessa espécie, quando influenciada pelo déficit hídrico. Tal fato foi parcialmente investigado no Capítulo 1 desta pesquisa, dentre três modos de aplicação e seis concentrações de Se testadas, em plantas de soja cultivadas em hidroponia, a fim de descobrir qual delas exerceria maiores efeitos positivos à fisiologia e a morfo-anatomia das plantas. Os resultados demonstraram que a aplicação de 80 μM de Se via pulverização foi promissora em condições ótimas e, potencialmente, promissora como indutora de tolerância à soja sob déficit hídrico. Diante disso, o objetivo deste capítulo foi avaliar os efeitos da pulverização foliar com 80 μM de Se, na forma de selenato de sódio (Na_2SeO_4), em plantas de soja no estágio vegetativo V_2 - V_3 submetidas ao déficit hídrico, induzido pelo polietilenoglicol (PEG 6000), para: (1) verificar se a aplicação foliar de Se diminuiu os sintomas do déficit hídrico em plantas de soja e (2) fornecer conhecimentos a respeito das alterações morfológicas, fisiológicas, anatômicas e bioquímicas desencadeadas pelo Se nas plantas de soja sob déficit hídrico. Para tanto, o cultivar EMBRAPA 48 foi escolhido, por ser um cultivar de soja modelo de tolerância à seca.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Condições de cultivo, tratamentos e delineamento experimental

Sementes de soja (*Glycine max* L.), cultivar EMBRAPA 48, foram obtidas a partir do Banco de Sementes do Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja do Bioagro/UFV, selecionadas quanto ao tamanho, cor e forma (visando à homogeneidade) e desinfestadas em hipoclorito de sódio 5%, por cinco minutos. As sementes foram lavadas em água destilada, secadas em papel toalha e depositadas sobre papel de germinação (Germitest[®]), o qual foi devidamente umedecido e depositado dentro de tubos de PVC, contendo solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) 100 mM, pH 5,5, onde permaneceram por sete dias, na ausência de luz, em sala de crescimento de plantas a 25 ± 10 °C e umidade relativa do ar de $50 \pm 20\%$. Após esse período, as plântulas foram transferidas para uma fonte de luz (para aclimação por dois dias) com intensidade de $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de radiação fotossinteticamente ativa, que foi medida com um sensor da Licor (Modelo Quantum). No 10º dia houve a seleção das plântulas, priorizando a uniformidade no tamanho, e transferência, na quantidade de uma plântula por vaso, para vasos com capacidade de 1,5 L, contendo solução nutritiva de Clark (Clark, 1975) pH 5,5, sob aeração constante, iluminação com intensidade de $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro. A cada dois dias, o pH das soluções foi corrigido ao seu valor inicial até o final do experimento.

Adicionalmente ao supracitado, no 22º dia, o experimento iniciou através da pulverização de 39 plantas que se encontravam no estágio vegetativo $V_2 - V_3$, com solução de Se, na forma de Na_2SeO_4 a $80 \mu\text{M}$ (Sigma-Aldrich, USA) adicionada de surfactante (Assist[®]) a 0,1%, que foi preparada no dia da pulverização e aplicada utilizando-se de um pulverizador com pressão constante, entre 8:00 e 10:00 horas da manhã, com umidade relativa do ar de 55%, velocidade do vento de 27 km/h e temperatura de 28 °C. O volume de calda calculado para a pulverização foi 342 l/ha e a porcentagem de cobertura da folha foi 54,75%. Decorridas 24 horas da pulverização, 52 plantas (sendo 26 plantas pulverizadas e 26 não pulverizadas) foram submetidas ao tratamento com déficit hídrico induzido pelo PEG, via solução nutritiva de Clark (pH 5,5) a -0,1 MPa. Transcorridas mais 24 horas, 26 plantas (sendo 13 delas pulverizadas e 13 não pulverizadas) tiveram suas soluções nutritivas renovadas por soluções a -0,4 MPa de PEG (pH 5,5), nas quais, permaneceram por

mais três dias, quando o experimento foi desmontado. É importante ressaltar que 26 das 52 plantas, inicialmente tratadas com PEG a -0,1 MPa, continuaram sob o mesmo tratamento até o final do experimento. As soluções tiveram seus valores de pH corrigidos para o valor inicial diariamente e as plantas foram avaliadas no 7º dia após a pulverização.

O experimento foi composto por 78 unidades experimentais, constituídas por seis tratamentos:

- 1) plantas pulverizadas com 80 µM de Se + hidratação plena,
- 2) plantas não pulverizadas com Se + hidratação plena,
- 3) plantas pulverizadas com 80 µM de Se + déficit hídrico induzido pelo PEG a -0,1MPa,
- 4) plantas não pulverizadas com Se + déficit hídrico induzido pelo PEG a -0,1 MPa,
- 5) plantas pulverizadas com 80 µM de Se + déficit hídrico induzido pelo PEG a -0,4 MPa e,
- 6) plantas não pulverizadas com Se + déficit hídrico induzido pelo PEG a -0,4 MPa.

O experimento foi conduzido com 13 repetições, na quantidade de uma planta por vaso, sendo cinco delas para a realização de análises de crescimento, fluorescência da clorofila *a*, trocas gasosas e quantificação de Se, três para microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura e cinco para as análises bioquímicas. Os vasos foram dispostos de forma inteiramente casualizada.

2.2.2 Determinação da concentração de Se total

A concentração de Se total (Se-T) foi determinada em cerca de 0,5 g de massa seca moída e homogeneizada de todas as folhas e raízes. As amostras foram solubilizadas em 2 mL de peróxido de hidrogênio 30% (Merck®) e 6 mL de ácido nítrico 65% (Merck®) a 90 °C, por quatro horas, em bloco digestor, conforme o proposto por Ellis et al., (2004). O material foi diluído em água ultra pura e as quantificações de Se-T realizadas por Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES; Perkin Elmer, modelo Optima 8300, com amostrador automático modelo S10) e os resultados expressos em mg.kg⁻¹. A solubilização química foi certificada por meio de amostras de controle interno, cuja recuperação foi de 103 ± 0,56% e de duas amostras de referência certificada

orgânicas, DORM 2 (National Research Council Canada) e IAEA 086 (International Atomic Energy Agency), cujos valores de recuperação foram, respectivamente, 107 e 100%. O limite de detecção da técnica (LDT) foi calculado para valores inferiores a $0,211 \text{ mg.kg}^{-1}$.

Quando foi possível, calculou-se o fator de translocação, que estima a habilidade da planta de translocar metais (Shi et al., 2011), a partir das concentrações de Se-T quantificadas, nas raízes e nas folhas das plantas.

2.2.3 Análises de crescimento

As plantas foram mensuradas, quanto ao seu comprimento da parte aérea e da raiz principal, antes da pulverização e após 1, 2, 3, 5 e 7 dias do início da exposição ao Se. Essas medições foram obtidas para a determinação do alongamento relativo [AR (%)] da parte aérea e da raiz das plantas e foram realizadas com auxílio de régua milimetrada, da gema apical ao hipocótilo (parte aérea) e do hipocótilo ao ápice da raiz (raiz principal). O alongamento relativo das plantas foi calculado, segundo o proposto por Hunt (1978), onde $AR = (\text{comprimento do tratado final} - \text{comprimento do tratado inicial} / \text{comprimento final controles} - \text{comprimento inicial controles}) * 100$.

A taxa de crescimento relativo (TCR) da parte aérea e da raiz foi determinada a partir da massa seca inicial de cada órgão, obtida por meio da coleta das plantas antes do início do tratamento, secagem em estufa por 72 horas a $65 \text{ }^\circ\text{C}$ e pesagem em balança analítica, e da massa seca final, obtida por meio da coleta no 6º dia após a exposição ao PEG, secagem por 72 horas e pesagem, conforme a equação proposta por Hunt (1978), em que $TCR = (\ln w_1 - \ln w_0) / (t_1 - t_0) \times 100$, onde a TCR foi expressa em termos de ganho de massa seca, em gramas por dia ($\text{g}^{-1}.\text{g}^{-1}.\text{dia}^{-1}$), ao longo do período experimental; $\ln w_1$ e $\ln w_0$: logaritmos neperianos da massa seca no final e no início do experimento, respectivamente; e $t_1 - t_0$ foi a duração do experimento, em dias (total de sete dias, compreendendo do dia da pulverização ao dia da avaliação final). A área foliar foi obtida no terceiro trifólio, das plantas de todos os tratamentos, por meio de um integrador de área foliar (Modelo 3100) e os resultados expressos em centímetros quadrados.

2.2.4 Determinação dos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* e de trocas gasosas

Os parâmetros de fluorescência no escuro; fluorescência inicial (F_o), fluorescência variável (F_v), fluorescência máxima (F_m) e rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m); foram obtidos entre 4:30 e 5:30 h da manhã. Os parâmetros de fluorescência no claro, fluorescência máxima no período iluminado (F_m') e fluorescência no estado estacionário (F_s) foram determinados entre 8 e 10 horas da manhã. Todas as análises foram realizadas no folíolo central da folha mais nova e totalmente expandida em todas as plantas avaliadas com auxílio de um analisador de gases a infravermelho (IRGA - modelo portátil LI-6400xt, LI-COR Biosciences Inc., Lincon, Nebraska, USA). A partir dos parâmetros de fluorescência obtidos no escuro e no claro foram calculados a fluorescência inicial no período iluminado (F_o'), fluorescência variável no período iluminado (F_v'), rendimento quântico efetivo do fotossistema II (F_v'/F_m'), o coeficiente do *quenching* fotoquímico (qP), o coeficiente do *quenching* não-fotoquímico (qN), a taxa de transporte de elétrons (ETR), o rendimento quântico efetivo do fotossistema II [$Y(II)$], o *quenching* não fotoquímico indicativo da dissipação de energia via ciclo das xantofilas [$Y(NPQ)$], o *quenching* fotoquímico das perdas não-reguladas [$Y(NO)$], o *quenching* não-fotoquímico (NPQ), a razão F_o/F_m' e a dissipação da energia radiante devido a fotoinibição (qL).

Os parâmetros de trocas gasosas: assimilação líquida de CO_2 (A_n), condutância estomática (g_s), taxa transpiratória (E), concentração interna de CO_2 (C_i) e razão C_i/C_a ; foram determinados entre 8:00 e 10:00 horas da manhã, também no folíolo central da folha mais nova e totalmente expandida, desenvolvida durante o período de déficit hídrico, com auxílio do IRGA, utilizando radiação fotossinteticamente ativa de $500 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, que foi estabelecida com base em curvas de luz elaboradas no dia anterior ao da avaliação fotossintética, com concentração de CO_2 ambiente (C_a). A partir desses parâmetros foram calculadas, a eficiência no uso da água (EUA) e a eficiência de carboxilação de CO_2 (A_n/C_i).

2.2.5 Caracterização anatômica e histométrica de folhas e raízes

A porção mediana do folíolo central da folha mais nova e totalmente expandida e amostras de 2 cm de segmento da raiz principal, a partir do ápice, foram fixadas em formaldeído:ácido acético 50% e desidratadas em série etflica a 70, 80, 90 e 100%, sequencialmente, por 2 horas para cada concentração. O material foi infiltrado e incluído em historresina metacrilato (Leica Historessin[®] Plus), conforme

as recomendações do fabricante, e afixados em blocos de madeira. Os cortes foram realizados transversalmente em micrótomo rotativo e depositados em lâmina de vidro. A coloração foi realizada mantendo-se o material imerso por 4 min em solução de azul de toluidina a 0,05% a pH 4,0 (O'Brien et al., 1964) e, em seguida, lavados em água corrente. Após a secagem, as lâminas foram montadas em resina *Permaunt*. A captura das imagens foi realizada por meio de um microscópio óptico (modelo AX70 com sistema de captura de imagem acoplado AxioCam HRc – Zeiss) e as imagens foram capturadas com zoom óptico de 10x e zoom digital de 1,5x. As análises morfométricas das imagens foram realizadas por meio do programa Image Pro-Plus Versão 4.5.029. Para essa avaliação, foram analisadas a região da nervura central, do limbo e o ápice da raiz, de três repetições de cada tratamento, cada uma delas com cinco sub-repetições, e os dados expressos em milímetros quadrados (região da nervura central e do ápice da raiz) e milímetros (região do limbo).

2.2.6 Microscopia eletrônica de varredura

A distribuição e abundância relativa (%) do cálcio (Ca), potássio (K), sódio (Na), fósforo (P), enxofre (S) e Se foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (modelo 1430 VP, LEO, Cambridge, Inglaterra), com sonda de raios-X acoplada (IXRF systems X-EDS, 15715, Brookford Drive, Houston, TX, 77059). Para essa análise, foram coletadas porções medianas do folíolo central de três repetições das folhas mais novas e totalmente expandidas de todos os tratamentos. Os cortes foram fixados em glutaraldeído (2,5%), submetidos à desidratação em série etílica crescente, secagem ao ponto crítico em CO₂ (CPD 030, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein), fixação em suporte com fita de carbono dupla face e recobrimento a partir de evaporação de carbono (Quorum Q150 T).

2.2.7 Determinação do teor relativo de água e análises bioquímicas

O teor relativo de água (*TRA*) das folhas foi determinado a partir da obtenção da massa fresca (*PF*) de 10 discos com 5 mm de diâmetro, do primeiro trifólio totalmente expandido, que foi coletado às 7 horas da manhã, da massa túrgida (*PT*), nos mesmos discos foliares, após 6 horas de hidratação e da massa seca desses discos (*PS*) após 72 horas de secagem em estufa a 65 °C, segundo a fórmula: $TRA = (PF - PS) / (PT - PS) * 100$, os valores foram expressos em porcentagem. O *TRA* das raízes foi obtido a partir da massa fresca (*PF*) da secção de 10 cm de 10 raízes secundárias, que

foram coletadas no momento do desmonte do experimento, da massa túrgida (*PT*), nos mesmos segmentos radiculares, após 6 horas de hidratação e da massa seca desses segmentos (*PS*), após 72 horas de secagem em estufa a 65 °C, segundo a mesma fórmula e, também, expressando os valores em porcentagem.

A quantificação de pigmentos cloroplastídicos (Ferne et al., 2001), das enzimas do sistema antioxidante, catalase (CAT) peroxidase total (POX) e redutase da glutatona (GR) (Anderson et al., 1995; Ribeiro et al., 2012), superóxido dismutase (SOD) e peroxidase do ascorbato (APX) (Nakano e Asada, 1981); o conteúdo de prolina (Bates et al., 1973), a peroxidação de lipídios (Gomes-Junior et al., 2006), a concentração de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Misra e Fridovich, 1971; Boveris et al., 2002) e de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Gay e Gebicki, 2000 e Kuo e Kao, 2003), além da concentração de açúcares solúveis, amido, proteínas solúveis e aminoácidos (Ferne et al., 2001) foi determinada em aproximadamente 100 mg de todas as folhas completamente expandidas e todas as raízes das plantas de soja, que foram coletadas e imediatamente armazenadas em nitrogênio líquido, no final do experimento. A determinação das densidades ópticas de cada metabólito foi realizada em leitor de microplaca MULTISKAN GO[®] e os cálculos foram realizados, conforme a Lei de Lambert Beer, utilizando os respectivos coeficientes de absorvidade molar das substâncias.

2.2.8 Análises Estatísticas

A significância da diferença entre as médias das repetições foi testada por meio do teste *t* de *Student*, com a mínima diferença significativa entre os tratamentos com e sem o fornecimento de Se verificada ao nível de significância de 5%. Para tanto, os dados atenderam a pressuposição de normalidade, pela aplicação do teste *Kolmogorov-Smirnov* ($\alpha > 0,05$). Quando os dados não seguiram a normalidade foram submetidos ao teste não paramétrico de *Mann-Whitney* ($p < 0,05$). Em alguns casos, foram realizadas análises de correlação ($p < 0,05$) para verificar o grau de associação entre as variáveis analisadas e seus tratamentos.

2.3 Resultados

2.3.1 Concentração de Se-T em folhas e raízes de plantas de soja

Segundo os resultados do teste *t*, a pulverização não favoreceu o acúmulo de Se nas plantas sob hidratação plena ($p > 0,05$), porém tal acúmulo foi notável nas plantas pulverizadas e sob déficit hídrico, para ambos potenciais avaliados ($p < 0,05$). Não houve translocação de Se das folhas para as raízes (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração de Se-T em folhas e raízes do cultivar de soja Embrapa 48, após sete dias da pulverização com 80 μM de Se.

Tratamentos	[Se] mg.kg ⁻¹ *		
	Folha**	Raiz	Fator de translocação
+ Se + HP	0,913 \pm 0,039 a	nd	***
- Se + HP	0,592 \pm 0,072 a	0,252 \pm 0,077	2,497 \pm 0,477
+ Se - 0,1 MPa	1,250 \pm 0,026 a	0,374 \pm 0,162	4,159 \pm 1,875
- Se - 0,1 MPa	0,559 \pm 0,013 b	0,299 \pm 0,088	2,060 \pm 0,648
+ Se - 0,4 MPa	0,839 \pm 0,029 a	nd	***
- Se - 0,4 MPa	0,640 \pm 0,022 b	nd	***

* Dados são médias \pm erro padrão de duas repetições (que foram constituídas por amostras compostas das 5 repetições por tratamento, tendo em vista a quantidade de massa seca disponível). ** Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre as plantas pulverizadas e àquelas não pulverizadas dentro de cada regime hídrico, segundo os resultados do teste *t* ($p < 0,05$). nd: abaixo do limite de detecção da técnica. *Tratamentos*: + Se + HP: plantas pulverizadas com Se e com hidratação plena; - Se + HP: plantas não pulverizadas e com hidratação plena; + Se - 0,1 MPa: plantas pulverizadas com Se e sob déficit hídrico a -0,1 MPa induzido pelo tratamento com PEG via solução nutritiva de Clark; - Se - 0,1 MPa: plantas não pulverizadas, mas sob déficit hídrico a -0,1 MPa induzido pelo tratamento com PEG via solução nutritiva de Clark; + Se - 0,4 MPa: plantas pulverizadas com Se e sob déficit hídrico a -0,4 MPa induzido pelo tratamento com PEG via solução nutritiva de Clark; - Se - 0,4 MPa: plantas não pulverizadas, mas sob déficit hídrico a -0,4 MPa induzido pelo tratamento com PEG via solução nutritiva de Clark.

2.3.2 Avaliação morfológica das plantas tratadas com Se e déficit hídrico

Em nível macroscópico, a pulverização com 80 μM de Se não proporcionou alterações morfológicas nas plantas sob hidratação plena, quando comparadas àquelas não pulverizadas. Por outro lado, decorridas 6 h da implementação do déficit hídrico a -0,4 MPa, percebeu-se que ocorreu a epinastia das folhas opostas e das primeiras folhas trifolioladas, além disso elas apresentaram-se murchas (Figura 1A), independente do tratamento com Se. Um dia após o início do tratamento a -0,4 MPa, as plantas começaram a apresentar clorose dos cotilédones e das margens foliares. Essa clorose foi mais aparente nas plantas tratadas na maior concentração de PEG (Figura 1B). No terceiro dia após o início do tratamento, a clorose espalhou-se por maior área foliar e, com o tempo, as folhas passaram a exibir as margens enrugadas

e/ou aparência ressecada (Figura 1C-D); tal alteração morfológica tornou-se ainda mais evidente no quarto dia da exposição (Figura 1E).

No sétimo dia de tratamento foi evidenciado que as plantas pulverizadas com Se apresentaram menor extensão de áreas cloróticas, quando comparadas às plantas não pulverizadas. Além disso, tornaram-se nítidas as diferenças entre as plantas supridas com PEG a -0,4 MPa, em relação aos demais tratamentos. Constatou-se redução da área foliar e evolução da clorose, enrolamento e murcha das folhas, amarelamento das raízes (Figura 2A-B) e abscisão das folhas mais velhas.

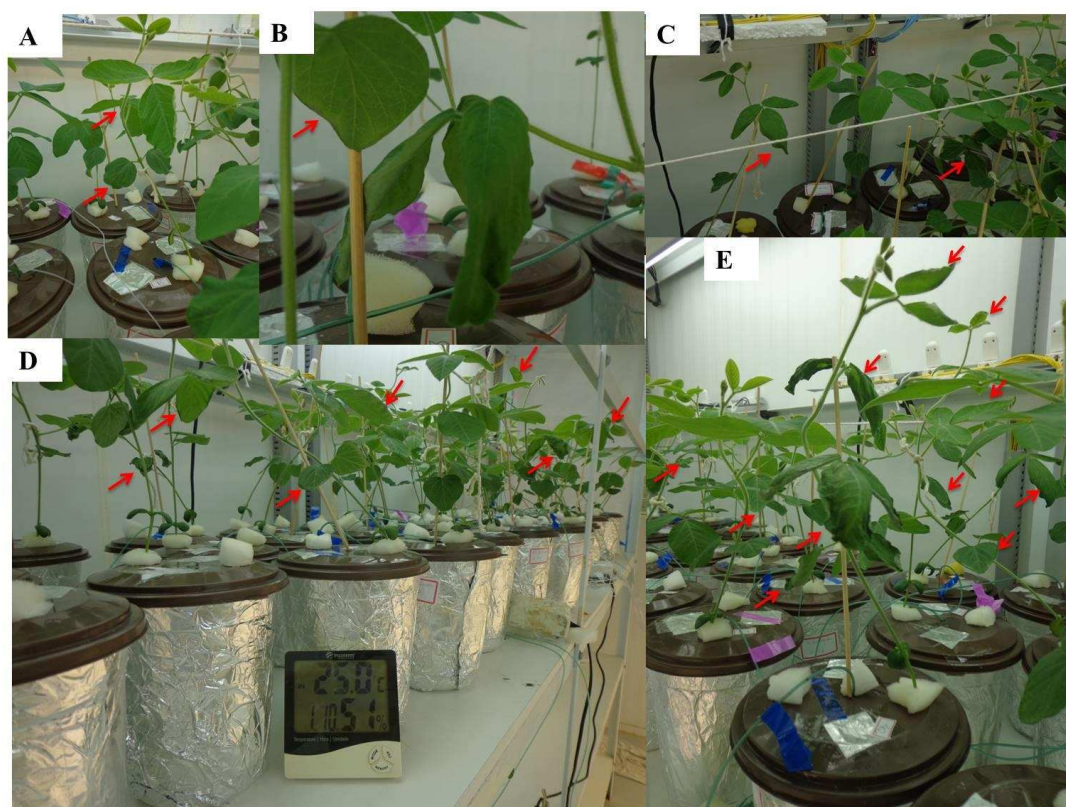


Figura 1. Efeitos macroscópicos resultantes dos tratamentos com Se e déficit hídrico a -0,4 MPa no estágio vegetativo V_3 - V_4 do cultivar de soja Embrapa 48. As setas indicam: folhas epinásticas e flácidas (A), folhas com áreas cloróticas (B), flácidas e ressecadas (C-E). *Tratamentos: + Se + HP: plantas pulverizadas com Se e com hidratação plena; - Se + HP: plantas não pulverizadas e com hidratação plena; + Se - 0,1 MPa: plantas pulverizadas com Se e sob déficit hídrico a -0,1 MPa induzido pelo tratamento com PEG via solução nutritiva de Clark; - Se - 0,1 MPa: plantas não pulverizadas, mas sob déficit hídrico a -0,1 MPa induzido pelo tratamento com PEG via solução nutritiva de Clark; + Se - 0,4 MPa: plantas pulverizadas com Se e sob déficit hídrico a -0,4 MPa induzido pelo tratamento com PEG via solução nutritiva de Clark; - Se - 0,4 MPa: plantas não pulverizadas, mas sob déficit hídrico a -0,4 MPa induzido pelo tratamento com PEG via solução nutritiva de Clark.*

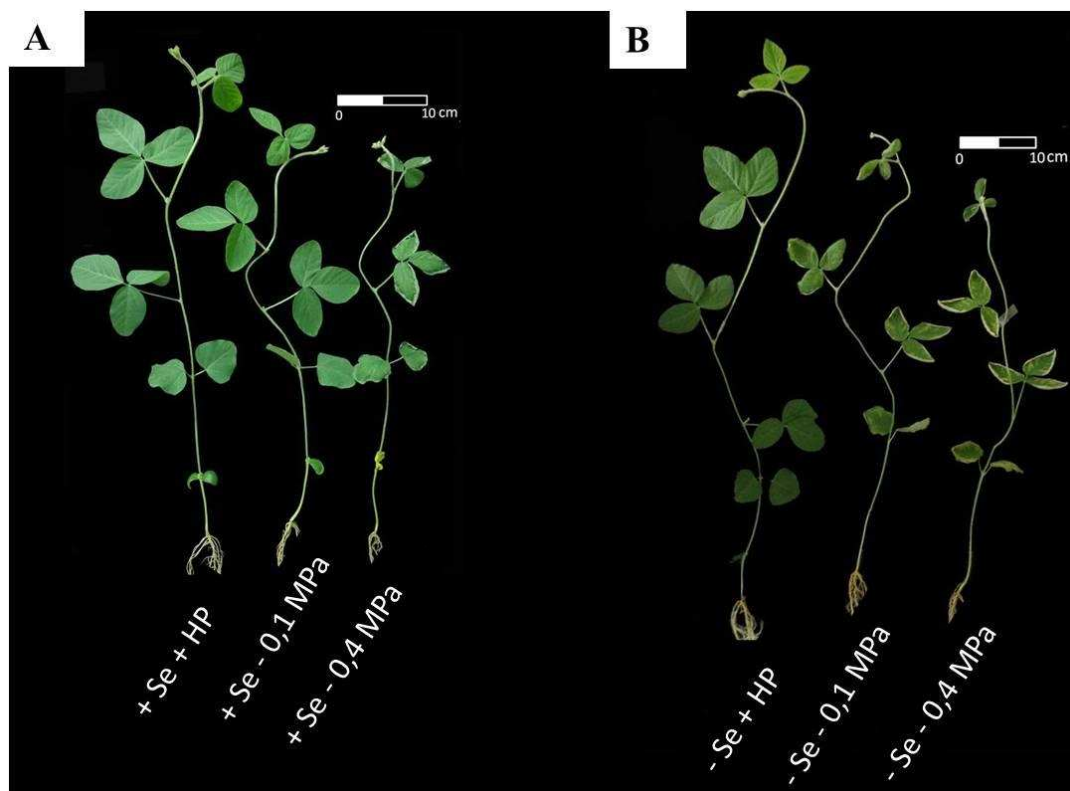


Figura 2. Plantas do cultivar de soja EMBRAPA 48 sete dias após a exposição ao Se via pulverização (A). Plantas do cultivar de soja EMBRAPA 48 não pulverizadas (B). Para legenda dos tratamentos ver figura 1.

2.3.3 Análises de crescimento e do teor relativo de água (TRA)

Não foram verificadas alterações induzidas pelo tratamento com Se sobre o alongamento relativo, a taxa de crescimento relativo e a massa seca das plantas, em relação às não pulverizadas dentro de cada regime hídrico, segundo os resultados do teste t ($p > 0,05$). Semelhantemente, o tratamento com Se não influenciou a área foliar das plantas sob hidratação plena e sob déficit hídrico a -0,1 MPa, porém verificou-se que o fornecimento de Se desencadeou reduções na área foliar das plantas sob déficit hídrico a -0,4 MPa (Figura 3) ($p < 0,05$).

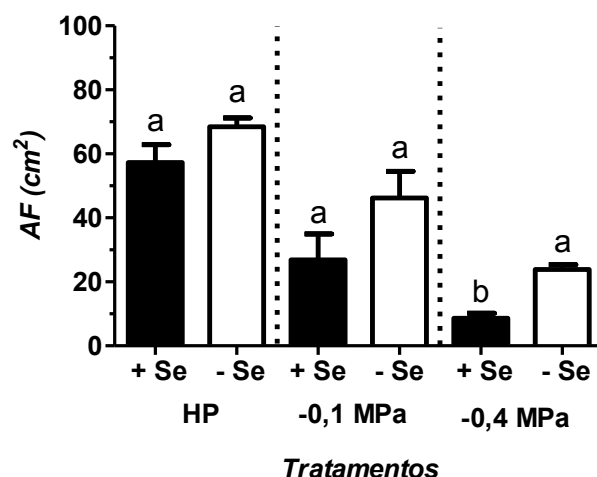


Figura 3. Efeitos do tratamento com Se sobre a área foliar (AF) do cultivar de soja EMBRAPA 48, sob diferentes regimes hídricos. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre as plantas pulverizadas e àquelas não pulverizadas dentro de cada regime hídrico, segundo os resultados do teste *t* ($p < 0,05$). Dados são médias \pm erro padrão de cinco repetições. Para legenda dos tratamentos ver figura 1.

O fornecimento de Se via pulverização não influenciou o *TRA* das folhas das plantas sob déficit hídrico a -0,1 MPa, mas promoveu incrementos no *TRA* das folhas das plantas sob hidratação plena e sob déficit hídrico a -0,4 MPa (Figura 4A). Não foram observados efeitos do Se sobre o *TRA* das raízes (Figura 4B).

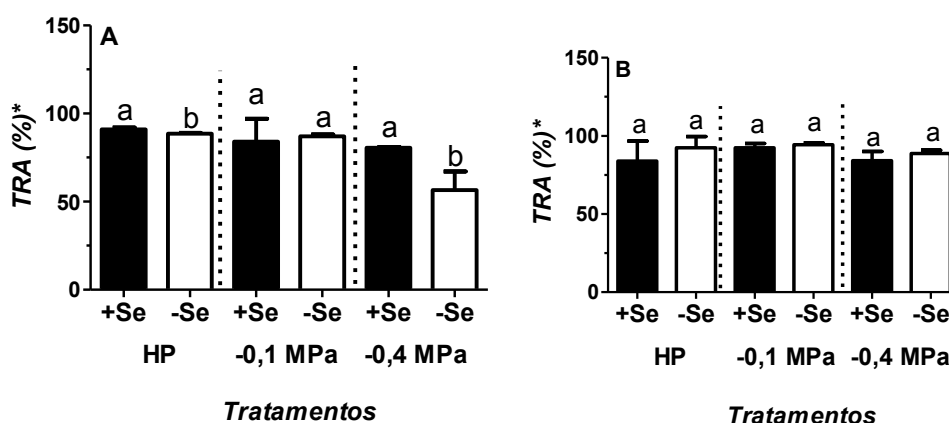


Figura 4. Efeitos do tratamento com Se sobre o teor relativo de água (TRA) de folhas (A) e raízes (B) do cultivar de soja EMBRAPA 48, em diferentes regimes hídricos. * Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre as plantas pulverizadas e àquelas não pulverizadas, dentro de cada regime hídrico, segundo os resultados do teste de *Mann-Whitney* ($p < 0,05$). Dados são medianas \pm limite superior de cinco repetições. Para legenda dos tratamentos ver figura 1.

2.3.4 Parâmetros de trocas gasosas e de fluorescência da clorofila *a*

O fornecimento de Se não induziu alterações sobre as trocas gasosas das plantas pulverizadas, em relação às não pulverizadas para todos os regimes hídricos

($p > 0,05$). Semelhantemente, o fornecimento de Se não influenciou os resultados da F_v , F_m , F_v/F_m , F_m' , F_s , F_o' , F_v' , F_v'/F_m' , $[Y(II)]$, $[Y(NO)]$, NPQ e F_o/F_m' ; porém, induziu efeitos positivos sobre os parâmetros de fluorescência da clorofila a : F_o , qL e qP (Figura 5).

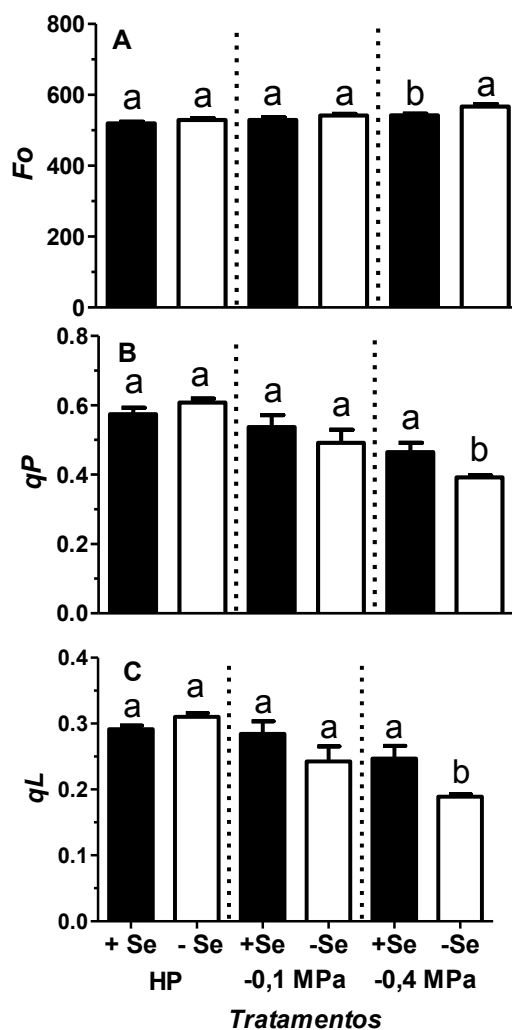


Figura 5. Efeitos do tratamento com Se sobre parâmetros de fluorescência da clorofila a do cultivar de soja EMBRAPA 48, em diferentes regimes hídricos. Parâmetros: fluorescência inicial (F_o) (A), coeficiente do *quenching* fotoquímico (qP) (B) e coeficiente relacionado à fotoinibição da fotossíntese (qL) (C). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre as plantas pulverizadas e àquelas não pulverizadas, dentro de cada regime hídrico, segundo os resultados do teste t ($p < 0,05$). Dados são médias \pm erro padrão de cinco repetições. Para legenda dos tratamentos ver figura 1.

2.3.5 Caracterização anatômica da folha e do ápice da raiz das plantas de soja

De forma geral, os tecidos da região do limbo foliar das plantas pulverizadas com Se e sob hidratação plena apresentaram-se sem grandes modificações, em relação às não pulverizadas (Figura 6A,D). Semelhantemente, não foram observadas

alterações no xilema nas plantas pulverizadas, mas observou-se maior área da secção transversal total dos feixes vasculares, devido a maior área e distribuição de floema (Figura 6 B,E). O floema apresentou maior distribuição na região da nervura, em relação ao verificado para as plantas não pulverizadas. Aparentemente, não foram constatadas diferenças para o ápice da raiz entre os tratamentos (Figura 6C,F).

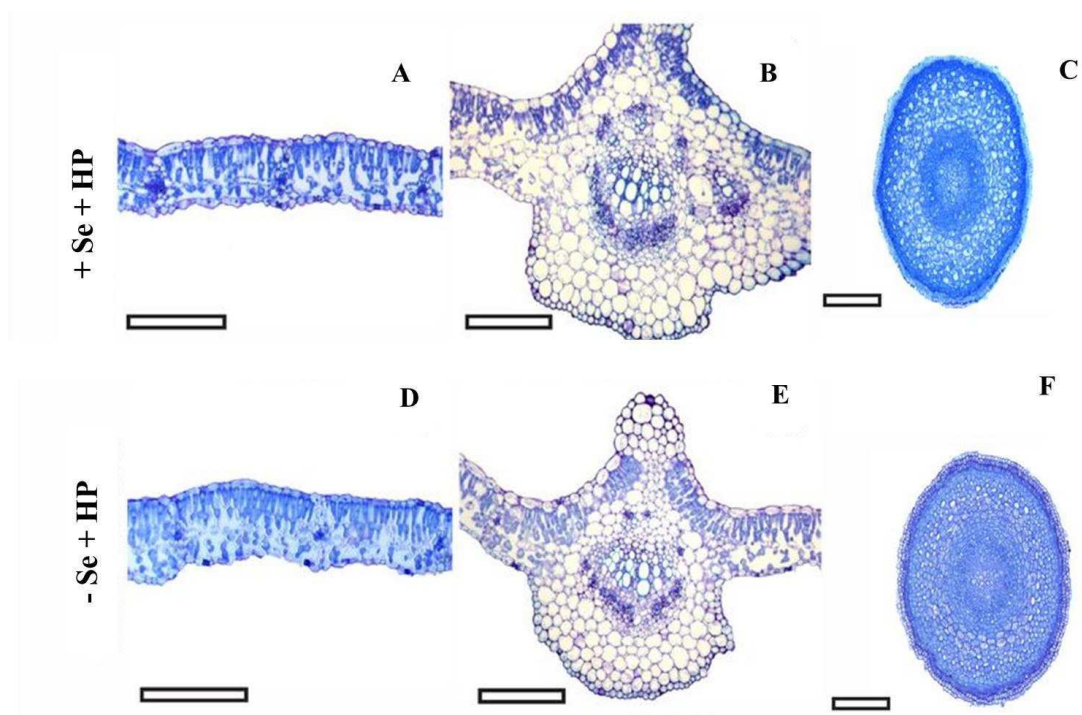


Figura 6. Limbo, nervura central e raiz (A-C) do cultivar de soja EMBRAPA 48 tratado com Se, sob hidratação plena. Limbo, nervura central e raiz (D-F) do cultivar de soja EMBRAPA 48 não tratado com Se, mas sob hidratação plena. Barras: limbo e nervura central: 50 μ m e raiz: 100 μ m.

Nas plantas submetidas ao déficit hídrico a -0,4 MPa, pôde-se observar que o fornecimento de Se não desencadeou modificações na epiderme abaxial, parênquima paliádico e na espessura do mesofilo, mas induziu alterações na epiderme adaxial (Figura 7A,D). Não foram constatadas modificações nos tecidos da região da nervura central (Figura 7B,E), mas observou-se que as raízes dessas plantas apresentaram menor diferenciação dos tecidos, quando comparadas aos das plantas não pulverizadas (Figura 7C,F).

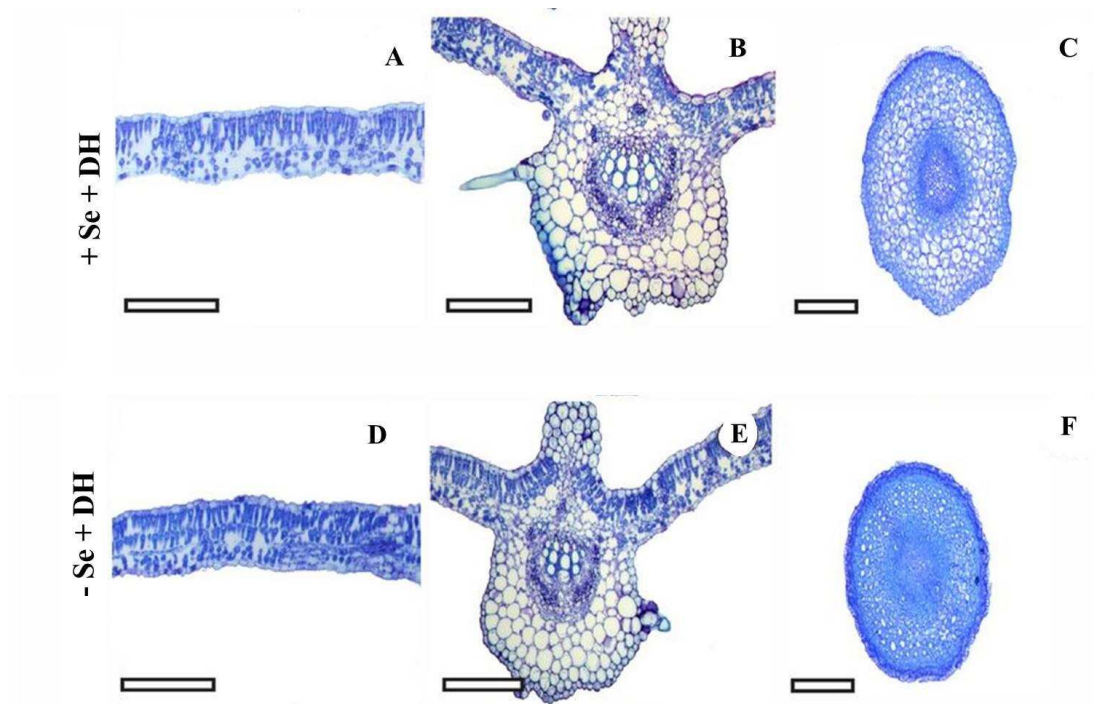


Figura 7. Limbo, nervura central e raiz (A-C) do cultivar de soja EMBRAPA 48 tratado com Se e sob déficit hídrico a -0,4 MPa. Limbo, nervura central e raiz (D-F) do cultivar de soja EMBRAPA 48 apenas sob déficit hídrico a -0,4 MPa. Barras: limbo e nervura central: 50 µm e raiz: 100 µm.

Análises quantitativas dos dados de anatomia foliar não revelaram modificações induzidas pelo Se sobre a área da secção transversal do xilema, a epiderme abaxial, o parênquima paliçádico e a espessura do mesofilo ($p > 0,05$). No entanto, foram observadas diferenças devido ao tratamento com Se sobre a área da secção transversal total do feixe vascular e a área da secção transversal do floema das plantas controle pulverizadas, em relação às não pulverizadas (Figura 8A-B). Também foi constatado que o fornecimento de Se reduziu a epiderme adaxial nas plantas sob déficit hídrico a -0,4 MPa e o parênquima esponjoso a -0,1 MPa (Figura 8C-D).

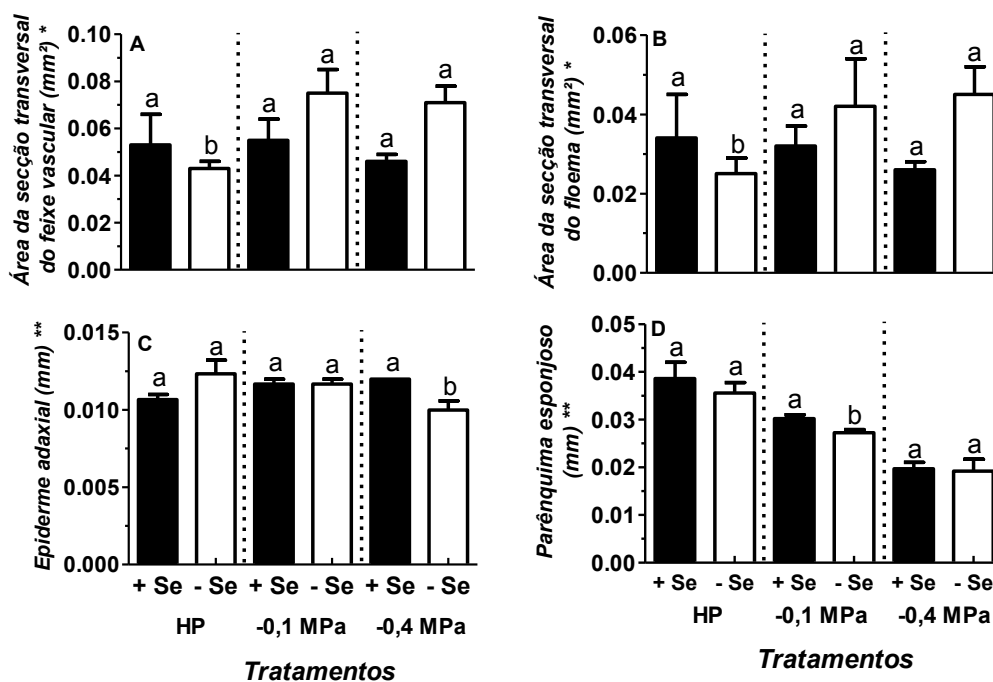


Figura 8. Dados referentes à anatomia da secção transversal do folíolo central da folha mais nova e totalmente expandida do cultivar de soja Embrapa 48, submetidas a diferentes regimes hídricos. * Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre as plantas pulverizadas e àquelas não pulverizadas dentro de cada regime hídrico, segundo os resultados do teste de *Mann-Whitney* ($p < 0,05$). ** Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas resultantes do teste *t* ($p < 0,05$). * Os valores são médias \pm erro padrão de três repetições. ** Os valores são medianas \pm limite superior de três repetições. Para legenda dos tratamentos ver figura 1.

Efeito do tratamento com Se foi verificado sobre a área da secção transversal total das raízes das plantas sob déficit hídrico a -0,1 MPa, quando comparada às raízes das plantas não pulverizadas (Figura 9).

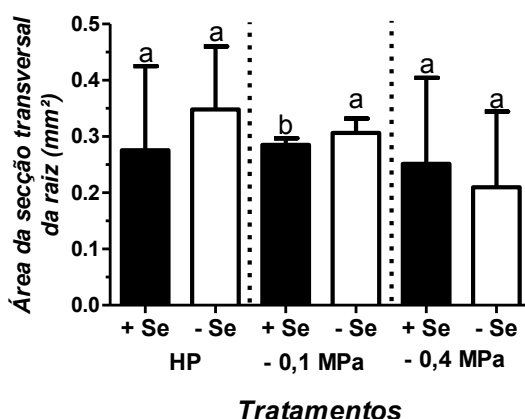


Figura 9. Áreas de secção transversal do ápice da raiz principal do cultivar de soja Embrapa 48, submetido a diferentes regimes hídricos. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre as plantas pulverizadas e àquelas não pulverizadas dentro de cada regime hídrico, segundo os resultados do teste de *Mann-Whitney* ($p < 0,05$). Os valores são medianas \pm limite superior de três repetições. Para legenda dos tratamentos ver figura 1.

2.3.6 Microscopia eletrônica de varredura

Dentre os elementos químicos investigados, não foram observadas diferenças significativas quanto à abundância relativa de Na, P, S e Se. Em contrapartida, observou-se que o Se induziu reduções na abundância relativa de Ca e incrementos na abundância relativa de K, nas plantas sob déficit hídrico a -0,1 MPa (Figura 10). Tais resultados foram fortemente correlacionados ($r: -0,98; p < 0,05$), sugerindo influência do Se na distribuição desses elementos.

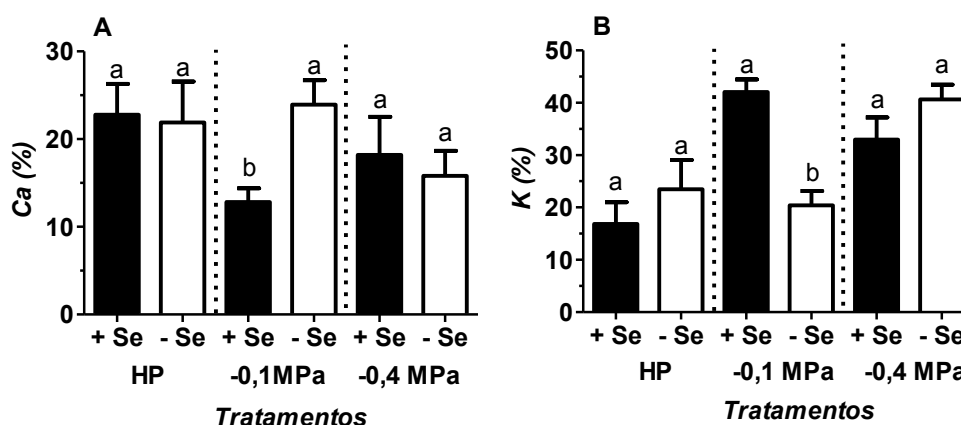


Figura 10. Abundância relativa (%) de cálcio (Ca) (A) e potássio (K) (B) avaliados por microscopia eletrônica de varredura com sonda de raios-X acoplada, em plantas de soja do cultivar EMBRAPA 48, submetidas a diferentes regimes hídricos. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre as plantas pulverizadas e àquelas não pulverizadas dentro de cada regime hídrico, segundo os resultados do teste t ($p < 0,05$). Dados são médias \pm erro padrão de três repetições. Para legenda dos tratamentos ver figura 1.

2.3.7 Análises Bioquímicas

Nenhuma influência da pulverização com Se sobre os teores de clorofilas b e de carotenoides foi constatada ($p > 0,05$). Porém, segundo os resultados do teste t , o Se desencadeou reduções na concentração de clorofilas a e na razão clorofilas a/b , das plantas sob hidratação plena ($p < 0,05$) (Figura 11A,B), além de incrementos no teor de clorofilas a nas plantas sob déficit hídrico a -0,4MPa.

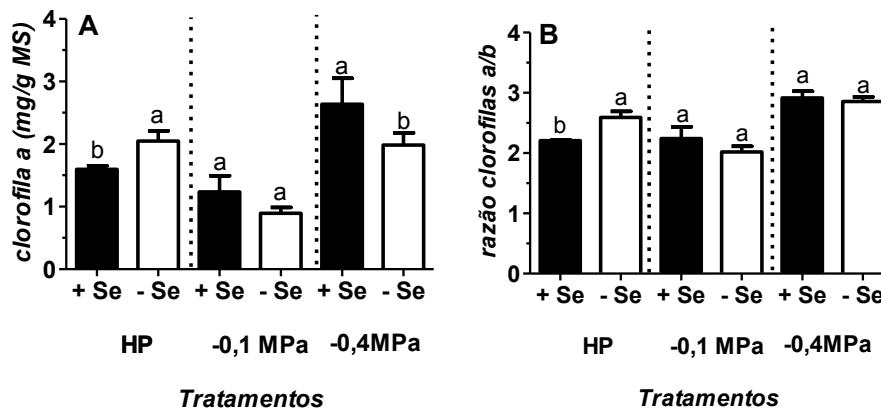


Figura 11. Efeitos do tratamento com Se sobre pigmentos fotossintéticos em plantas do cultivar de soja EMBRAPA 48, submetidas a diferentes regimes hídricos. Parâmetros: clorofila *a* (A) e razão clorofila *a/b* (B). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre as plantas pulverizadas e àquelas não pulverizadas dentro de cada regime hídrico, segundo os resultados do teste *t* ($p < 0,05$). Dados são médias \pm erro padrão de cinco repetições. *Para legenda dos tratamentos ver figura 1.*

Com relação ao sistema antioxidativo, observou-se que o Se não influenciou a atividade das enzimas SOD, CAT, APX e GR nas folhas e nas raízes de todas as plantas avaliadas ($p > 0,05$). No entanto, o Se aumentou a atividade da enzima POX nas folhas das plantas sob hidratação plena (Figura 12A) e reduziu a atividade desta enzima nas raízes das plantas sob déficit hídrico a -0,1 MPa (Figura 12B). Adicionalmente, o tratamento com Se aumentou o teor de $O_2^{\cdot -}$ foliar e radicular sob déficit hídrico induzido pelo PEG a -0,4 e -0,1 MPa, respectivamente (Figura 12C,D). O Se também reduziu o teor de H_2O_2 nas folhas das plantas sob hidratação plena e nas raízes das plantas submetidas a déficit hídrico a -0,4 MPa (Figura 13E,F) e aumentou o teor de peroxidação de lipídios nas folhas das plantas sob hidratação plena (Figura 12G). Nenhuma influência do Se foi observada sobre o teor de peroxidação de lipídios nas raízes ($p > 0,05$) (Figura 12H).

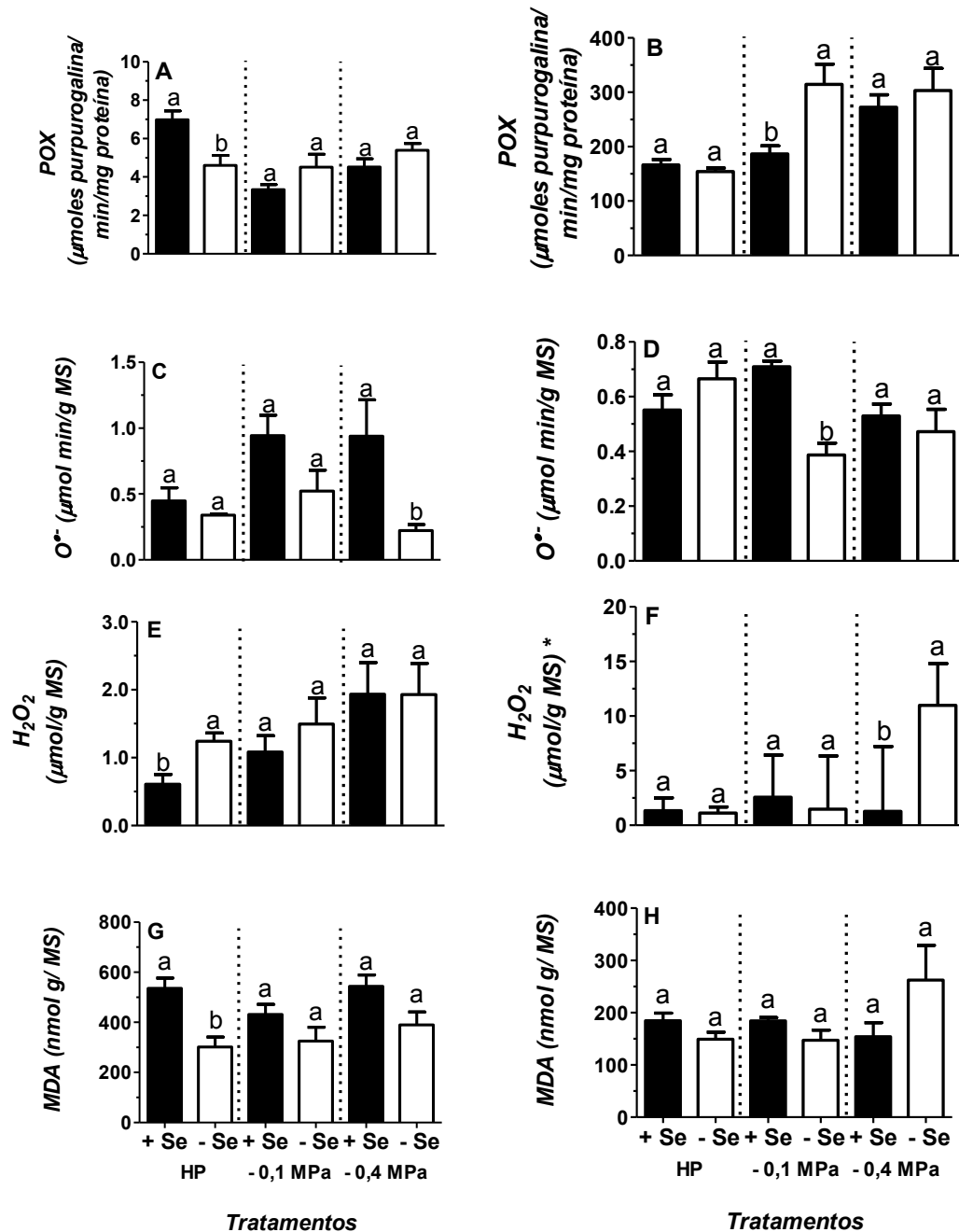


Figura 12. Efeitos do tratamento com Se sobre a atividade da enzima peroxidase total (POX) nas folhas (A) e nas raízes (B), teores de ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) nas folhas (C), nas raízes (D), teores de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas folhas (E) e raízes (F) e teor de peroxidação de lipídios (MDA) nas folhas (G) e raízes (H) do cultivar de soja EMBRAPA 48, submetido a diferentes regimes hídricos. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre as plantas pulverizadas e àquelas não pulverizadas dentro de cada regime hídrico, segundo os resultados do teste *t* ($p < 0,05$). * Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas resultantes do teste de *Mann-Whitney* ($p < 0,05$). Dados são médias \pm erro padrão de cinco repetições. Dados são medianas \pm limite superior de cinco repetições. Para legenda dos tratamentos ver figura 1.

O tratamento com Se não influenciou o acúmulo de prolina nas folhas e nas raízes das plantas dos três regimes hídricos ($p > 0,05$). Semelhantemente, ele

também não exerceu efeitos sobre os teores de frutose em folhas e raízes, nos teores de glicose nas raízes e de sacarose nas folhas das plantas dos três regimes hídricos ($p > 0,05$). Por outro lado, os resultados do teste t demonstraram que o Se reduziu o teor de glicose nas folhas das plantas sob déficit hídrico induzido pelo PEG a -0,4 MPa e o teor de sacarose nas raízes das plantas sob hidratação plena (Figura 13A,B).

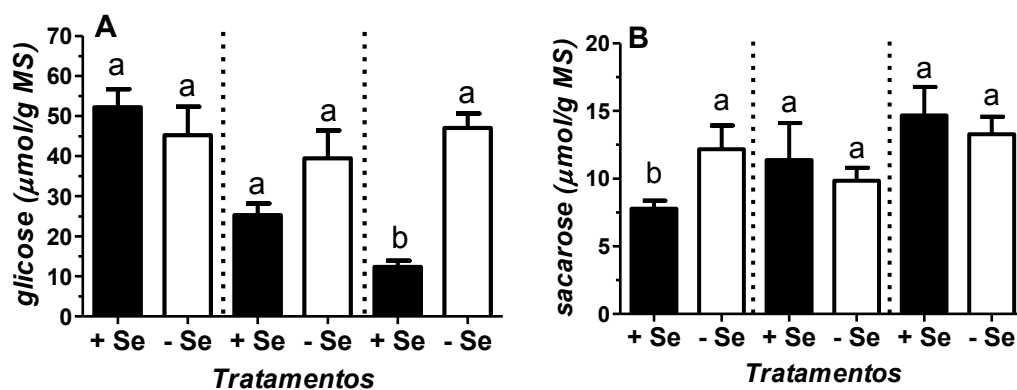


Figura 13. Efeitos do tratamento com Se sobre os teores de glicose em folhas (A) e sacarose em raízes (B) do cultivar de soja EMBRAPA 48, submetido a diferentes regimes hídricos. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre as plantas pulverizadas e àquelas não pulverizadas dentro de cada regime hídrico, segundo os resultados do teste t ($p < 0,05$). Dados são médias \pm erro padrão de cinco repetições. Para legenda dos tratamentos ver figura 1.

2.4 Discussão

O fornecimento de Se via pulverização influenciou vários aspectos fisiológicos e morfo-anatômicos das plantas de soja, para as três condições hídricas avaliadas. Tal fato demonstrou que o cultivar de soja EMBRAPA 48 recorreu ao efeito antioxidante do Se para intensificar as suas funções celulares, conforme o também observado por Djanaguiraman et al., (2005), Ardebili et al., (2014) e Hu et al., (2014) em soja.

Nas plantas sob hidratação plena, a ausência de diferenças na concentração de Se-T, pode estar relacionada à sua diluição nos tecidos, conforme ocorreu o acúmulo de biomassa (Tinker, 1981). Nessas plantas, também constatou-se que, mesmo estando presente em concentrações-traço, o Se favoreceu maior teor relativo de água foliar, sendo esta uma evidência da sua atuação sobre o *status* hídrico da soja hidratada, conforme o também observado em cevada por Habibi (2013), mas não constatado em outras espécies cultivadas, como trigo (Hajiboland et al., 2014; Nawaz

et al., 2015) e milho (Sajedi et al., 2011; Nawaz et al., 2016). Paralelamente ao maior teor relativo de água, constatou-se que o Se favoreceu maior área total dos feixes vasculares, devido ao aumento da área de floema. Uma vez que, a pulverização favorece o transporte do selenato através deste tecido (Poggi et al., 2000; Boldrin et al., 2013), é possível que o Se tenha um papel importante na biossíntese de células de floema em soja. Nesse sentido, ele pode ter exercido efeitos sobre a exportação de sacarose para as raízes.

As alterações bioquímicas que foram induzidas pelo Se nas plantas hidratadas não foram suficientes para esclarecer os mecanismos envolvidos em suas respostas ao Se. Dentre essas alterações, não está claro o porquê da redução no teor de pigmentos e do aumento na peroxidação de lipídios. Sabe-se que o Se aumenta o teor de clorofilas *a* em plantas de milho, sob condições de plena hidratação (Nawaz et al., 2016); e, que, tanto a redução no teor de clorofilas, quanto o aumento na peroxidação de lipídios são sintomas de toxicidade por excesso de Se (Mostofa et al., 2017; Schiavon e Pilon-Smits, 2017). No entanto, a ausência de correlação entre a peroxidação lipídica e o teor de clorofilas ($r: 0,75; p > 0,05$), descarta a possibilidade do Se ter sido aplicado em excesso. Pode-se afirmar que o aumento na atividade da enzima POX ocorreu para reduzir a produção de H_2O_2 ($r: 0,97; p < 0,05$). Nesse sentido, é possível que o fornecimento de Se tenha aumentado a concentração de H_2O_2 , como uma estratégia de sinalização, conforme o observado por Lehotai et al., (2012). Tal estratégia pode ter sido desenvolvida para a formação do floema.

A nítida evolução da murcha das folhas, o ressecamento das margens foliares e dos ápices das raízes foram evidências da redução do *status* hídrico das plantas, em função do potencial hídrico conferido pelas soluções nutritivas. Essas alterações foram morfológicamente inexpressivas, nas folhas e nas raízes das plantas sob déficit hídrico a -0,1 MPa, mas foram expressivas na parte aérea das plantas submetidas ao déficit hídrico a -0,4 MPa.

Sob déficit hídrico a -0,1 MPa, o Se proporcionou o incremento na espessura do parênquima esponjoso. Esse incremento pode estar relacionado à maior capacidade de armazenamento de CO_2 nesse tecido, para auxiliar as respostas das plantas ao estresse (Grisi et al., 2008; Pereira et al., 2014). Além disso, nessas plantas, o aumento da abundância relativa de K e a redução na abundância relativa de Ca, induzido pelo Se, sugerem alteração no balanço de íons das células-guarda por meio da regulação de canais de influxo de K^+ e de Ca^{2+} . A forte correlação negativa

entre K e Ca ($r: -0,98; p < 0,05$), juntamente com o papel que o Se exerce na regulação da homeostase e do transporte de nutrientes podem explicar tal fenômeno (Hawrilak-Nowak et al., 2015; Drahonovski et al., 2016). O envolvimento do K nas respostas fotossintéticas e anatômicas de plantas de eucalipto foi previamente descrito, por Battie-Laclau et al., (2014) e pode estar ocorrendo em soja.

Nas raízes das plantas sob déficit hídrico a $-0,1$ MPa, o Se reduziu a área da secção transversal total da raiz principal, favorecendo, dessa forma, maior superfície de contato, já que raízes finas são dominantes na absorção de nutrientes e as que mais extraem água do solo (Santos et al., 2005; Rosado et al., 2011). O aumento no teor de $O_2^{\cdot -}$ nas raízes pode ter ocorrido em função da viscosidade do PEG, ao influenciar a absorção de água pelas raízes, minimizar o número de pontes de hidrogênio entre o PEG e a água e, assim, influenciar a disponibilidade hídrica para as plantas, conforme o proposto por Villela et al., (1991).

Os resultados indicaram que as plantas sob déficit hídrico a $-0,4$ MPa, desenvolveram um mecanismo de aclimatação ao estresse, baseado principalmente em respostas morfo-anatômicas. Essas respostas envolveram tanto a redução da área foliar, quanto o aumento da espessura da epiderme adaxial, conforme evidenciou o coeficiente de correlação ($r: -0,96; p < 0,05$). O fato da análise de correlação, entre a área foliar e o teor de clorofilas *a* não ter sido significativa ($p > 0,05$), exclui a ideia de que a redução da área foliar teria favorecido a concentração desses pigmentos. Nesse sentido, é possível, que o Se tenha intensificado a redução da área foliar e a expansão das células da epiderme adaxial, para minimizar a área de superfície de transpiração e, assim, manter o conteúdo de água dos tecidos, induzindo tolerância ao déficit hídrico. A energia para manter essas alterações morfo-anatômicas pode ter sido obtida a partir do consumo de glicose, limitando, assim, o estabelecimento de efeitos mais expressivos, resultantes do déficit hídrico. Este consumo pode ter sido responsável pela ausência da indução ao acúmulo de substâncias osmorreguladoras, como prolina, aminoácidos, além de outros açúcares solúveis, contrariamente ao verificado por Yao et al., (2009); Nawaz et al., (2015) e Pandey e Gupta (2015).

Ainda nas folhas das plantas sob déficit hídrico a $-0,4$ MPa, o tratamento com Se pode, ter favorecido o aumento do qP , devido a reduções na F_o , conferindo às plantas melhor *status* fisiológico e morfo-anatômico. Tal resposta pode indicar que o Se está envolvido na regulação da fluorescência em soja, sob déficit hídrico. Apesar de não ter sido observada relação entre o aumento de qP e o teor de clorofilas *a* ($p >$

0,05), é possível supor que esse mecanismo de regulação envolva a biossíntese de clorofilas, tendo em vista que pode haver o aumento de pigmentos fotossintéticos em plantas sob estresse (Yao et al., 2009; Zhang et al., 2016). Nas raízes dessas plantas, a redução do teor de H_2O_2 , pode estar associada ao seu papel como sinalizador e estão de acordo com os resultados verificados por Wang e Xu (2011) ao observarem reduções no acúmulo de H_2O_2 , em plantas tratadas com Se.

A ausência de diferenças significativas sobre as trocas gasosas e a atividade das enzimas SOD, CAT, APX e GR, entre os tratamentos com e sem Se, pode estar relacionada à aclimação das plantas aos tratamentos. Tal aclimação pode explicar, o porquê da ausência de efeitos mais expressivos sobre as respostas fisiológicas e morfo-anatômicas das plantas, como alterações na razão Ci/Ca , Fv/Fm e área da secção transversal total de xilema. Nesse sentido, é possível que o tempo de exposição das plantas aos tratamentos tenha sido o principal responsável inexpressiva atividade enzimática, dessa forma a permanência do estresse pode ter suprimido as respostas enzimáticas das plantas.

2.5 Conclusões

Alterações fisiológicas, morfo-anatômicas e bioquímicas nas plantas tratadas com Se e sob déficit hídrico, indicaram que o cultivar de soja EMBRAPA 48 recorreu ao efeito antioxidante do Se, para atenuar alguns dos principais sintomas de déficit hídrico. Os mecanismos envolvidos na proteção das plantas pulverizadas a esse estresse envolveram, principalmente, modificações na espessura da epiderme adaxial, do parênquima esponjoso, da área da secção transversal total de floema nas folhas e da área da secção transversal total da raiz, além de mudanças nos níveis de Ca e K e alterações nos teores de espécies reativas de oxigênio, em função do nível de estresse. Uma vez que os resultados indicaram estresse oxidativo, com a inexpressiva atividade das principais enzimas do sistema antioxidativo, não foi possível esclarecer os mecanismos bioquímicos envolvidos nas respostas de evitação ao estresse. Além disso, também é possível que o tempo de exposição das plantas ao PEG tenha sido excessivo, suprimindo, assim, seu sistema antioxidativo enzimático. Diante disso, recomenda-se realizar avaliações do sistema antioxidativo das plantas sob menor tempo de exposição ao déficit hídrico, além de investigar outros

mecanismos e/ou rotas que possam estar envolvidas nas respostas das plantas pulverizadas com Se e submetidas ao déficit hídrico, como a expressão de genes e o teor de metabólitos.

2.6 Referências

Anderson MD, Prasad TK, Stewart CR (1995) Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. **Plant Physiol** 109:1247-1257

Ardebili NO, Saadatmand S, Niknam V, Khavari-Nejad RA (2014) The alleviating effects of selenium and salicylic acid in salinity exposed soybean. **Acta Physiol Plant** 36:3199-3205

Bates LS, Waldern RP, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant Soil** 39:205-207

Battie-Laclau P, Laclau J-P, Beri C, Mietton L, Muniz MRA, Arenque BC, Piccolo MC, Jordan-Meille L, Bouillet J-P, Nouvellon Y (2014) Photosynthetic and anatomical responses of *Eucalyptus grandis* leaves to potassium and sodium supply in a field experiment. **Plant Cell Environ** 37:70-81

Blum A (2016) Osmotic adjustment is a prime drought stress adaptive engine in support of plant production. **Plant Cell Environ** 1:4-10

Boldrin PF, Faquin V, Ramos SJ, Boldrin KVF, Ávila FW, Guilherme LRG (2013) Soil and foliar application of selenium in rice biofortification. **J Food Compost Anal** 31:238-244

Boveris A, Alvarez S, Bustamante J, Valdez L (2002) Measurement of superoxide radical and hydrogen peroxide production in isolated cells and subcellular organelles. **Methods Enzymol** 349:280-287

Clark J (1975) Agriculture. **Food Chem** 23:458-460

Djanaguiraman M, Devi DD, Shanker AK, Sheeba JÁ, Bangarusamy U (2005) Selenium - an antioxidative protectant in soybean during senescence. **Plant Soil** 272:77-86

Drahonovský J, Száková J, Mestek O, Tremlová J, Kaňa A, Najmanová J, Tlustos P (2016) Selenium uptake, transformation and inter-element interactions by selected wildlife plant species after foliar selenate application. **Environ Exp Bot** 125:12-19

Ellis DR, Sors TG, Brunk DG, Albrecht C, Orser C, Lahner B, Wood KV, Harris HH, Pickering IJ, Salt DE (2004) Production of Se-methylselenocysteine in transgenic plants expressing selenocysteine methyltransferase. **BMC Plant Biol** 4:1-11

- Fernie AR, Roscher A, Ratcliffe RG, Kruger NJ (2001) Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. **Planta** 212:25-263
- Gay C, Gebicki JM (2000) A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric–xylenol orange hydroperoxide assay. **Anal Biochem** 284:217-220
- Germ M, Kreft I, Stibilj V, Urbanc-Bercic O (2007) Combined effects of selenium and drought on photosynthesis and mitochondrial respiration in potato. **Plant Physiol Biochem** 45:162-167
- Gomes-Junior RA, Moldes CA, Delite FS, Pompeu GB, Gratão PL, Mazzafera P, Lea PJ, Azevedo RA (2006) Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. **Chemosphere** 65:1330-1337
- Grisi FA, Alves JD, Castro EM, Oliveira C, Melo LA (2008) Avaliações anatômicas foliares em mudas de café ‘Catuaí’ e ‘Siriema’ submetidas ao estresse hídrico. **Ci Agrotecnol** 36:1730-1736
- Habibi G (2013) Effect of drought stress and selenium spraying on photosynthesis and antioxidant activity of spring barley. **Acta Agric Slov** 101:31-39
- Hajiboland R, Sadeghzadeh N, Sadeghzadeh B (2014) Effect of Se application on photosynthesis, osmolytes and water relations in two durum wheat (*Triticum durum* L.) genotypes under drought stress. **Acta Agric Slov** 103:167-179
- Hawrylak-Nowak B, Matraszek R, Pogorzelec M (2015) The dual effects of two inorganic selenium forms on the growth, selected physiological parameters and macronutrients accumulation in cucumber plants. **Acta Physiol Plant** 37:41
- Hu J, Zhao Q, Cheng X, Selomutya C, Bai C, Zhu X, Li X, Xiong H (2014) Antioxidant activities of Se-SPI produced from soybean as accumulation and biotransformation reactor of natural selenium. **Food Chem** 146:531-537
- Hunt R (1978) Plant growth analysis. Studies in Biology Series No. 96. **Edward Arnold Ltd.**, London, U.K. 57p
- Hussain S, Khan F, Cao W, Wu L, Geng M (2016) Seed priming alters the production and detoxification of reactive oxygen intermediates in rice seedlings grown under sub-optimal temperature and nutrient supply. **Front Plant Sci** 7:439
- Ji H, Liu L, Li K, Xie Q, Wang Z, Zhao X, Li X (2014) PEG-mediated osmotic stress induces premature differentiation of the root apical meristem and out growth of lateral roots in wheat. **J Exp Bot** 65:4863-4872
- Karami S, Modarres Sanavy SAM, Ghanenpoor S, Keshavarz H (2016) Effect of foliar zinc application on yield, physiological traits and seed vigor of two soybean cultivars under water deficit. **Not Sci Biol** 2:181-191
- Kaur S, Nayyar, H (2015) Selenium fertilization to salt-stressed mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) plants reduces sodium uptake, improves reproductive function, pod set and seed yield **Sci Hort** 197:304-317

- Kuo MC, Kao CH (2003) Aluminium effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. **Biol Plantarum** 46:149-152
- Kuznetsov VV, Kholodova VP, Yagodin B (2003) Selenium regulates the water status of plants exposed to drought. **Dokl Biol Sci** 390:266-268
- Lehotai N, Kolbert Z, Peto A, Feigl G, Ordog A, Kumar D, Tari I, Erdei L. (2012) Selenite-induced hormonal and signalling mechanisms during root growth of *Arabidopsis thaliana* L. **J Exp Bot** 63:5677-5687
- Longchamp M, Castrec-Rouelle M, Biron P, Bariac T (2015) Variations in the accumulation, localization and rate of metabolization of selenium in mature *Zea mays* plants supplied with selenite or selenate. **Food Chem** 182:128-135
- Makbull S, Saruhan Guler N, Durmus N, Guven S (2011) Changes in anatomical and physiological parameters of soybean under drought stress. **Turk J Bot** 35:369-377
- Maraghni M, Gorai M, Neffati M, Labeke MCV (2014) Differential responses to drought stress in leaves and roots of wild jujube, *Ziziphus lotus*. **Acta Physiol Plant** 36:945-953
- Misra HP, Fridovich I (1971) The generation of superoxide radical during the autoxidation of ferredoxins. **J Biol Chem** 246:6886-6890
- Mostofa MG, Hossain MA, Siddiqui MN, Fujita M, Tran L-SP (2017) Phenotypical, physiological and biochemical analyses provide insight into selenium-induced phytotoxicity in rice plants. **Chemosphere** 178:212-223
- Moulick D, Ghosh D, Santra SC (2016) Evaluation of effectiveness of seed priming with selenium in rice during germination under arsenic stress. **Plant Physiol Biochem** 109:571-578
- Mroczek-Zdyrska M, Strubinska J, Hanaka A (2017) Selenium improves physiological parameters and alleviates oxidative stress in shoots of lead-exposed *Vicia faba* L. minor plants grown under phosphorus-deficient conditions. **J Plant Growth Regul** 36:186-199
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen-peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach-chloroplasts. **Plant Cell Physiol** 22:867-880
- Nawaz F, Asraf MY, Ahmad R, Waraich EA, Shabbir RN (2013) Selenium (Se) regulates seedling growth in wheat under drought stress. **Adv Chem** 2013:1-7
- Nawaz F, Ahmad R, Ashraf MY, Waraich EA, Khan SZ (2015) Effect of selenium foliar spray on physiological and biochemical processes and chemical constituents of wheat under drought stress. **Ecotoxicol Environ Safety** 113:191-200
- Nawaz F, Ashraf MY, Ahmad R, Waraich EA, Shabbir RN, Hussain RA (2016) Selenium supply methods and time of application influence spring wheat (*Triticum aestivum* L.) yield under water deficit conditions. **J Agric Sci** 155:643-656
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **Protoplasma** 59:368-373

- Pandey C, Gupta M (2015) Selenium and auxin mitigates arsenic stress in rice (*Oryza sativa* L.) by combining the role of stress indicators, modulators and genotoxicity assay. **J Hazard Mater** 287:384–391
- Pereira FJ, Castro EM, Oliveira C, Pires MF, Pereira MP, Ramos SJ, Faquin V (2014) Lead tolerance of water hyacinth (*Eichhornia crassipes* Mart. - Pontederiaceae) as defined by anatomical and physiological traits. **An Acad Bras Cienc** 86:1423-1433
- Pilon-Smits EA, Quinn CF, Tapken W, Malagoli M, Schiavon M (2009) Physiological functions of beneficial elements. **Curr Opin Plant Biol** 12:267-274
- Poggi V, Arcioni A, Filippini P, Pifferi PG (2000) Foliar application of selenite and selenate to potato (*Solanum tuberosum*): effect of a ligand agent on selenium content of tubers. **J Agric Food Chem** 48:4749-4751
- Proietti P, Nasini L, Buono DD, D'Amato R, Tedeschini E, Businelli D (2013) Selenium protects olive (*Olea europaea* L.) from drought stress. **Sci Hort** 164:165-171
- Ribeiro C, Cambraia J, Pereira PPH, Da Fonseca JEM (2012) Antioxidant system response induced by aluminum in two rice cultivars. **Braz J Plant Physiol** 24:107-116
- Rosado BHP, Martins AC, Colomeu TC, Oliveira RS, Joly CA, Aidar MPM (2011) Fine root biomass and root length density in a lowland and montane tropical rain forest, SP, Brazil. **Biota Neotrop** 11:203-209
- Sajedi N, Madani H, Naderi A (2011) Effect of microelements and selenium on superoxide dismutase enzyme, malondialdehyde activity and grain yield maize (*Zea mays* L.) under water deficit stress. **Not Bot Horti Agrobo** 39:153-159
- Santos DB, Coelho EF, Azevedo CAV (2005) Absorção de água pelas raízes do limoeiro sob distintas frequências de irrigação. **Rev Bras Engen Agr Amb** 9:327-333
- Schiavon M, Pilon-Smits EAH (2017) The fascinating facets of plant selenium accumulation - biochemistry, physiology, evolution and ecology. **New Phytol** 213:1582-1596
- Shi X, Zhang X, Chen G, Chen Y, Wang L, Shan X (2011) Seedling growth and metal accumulation of selected woody species in copper and lead/zinc mine tailings. **J Environ Sci** 23:266-274
- Tadina N, Germ M, Kreft I, Breznik B, Gaberscik A (2007) Effects of water deficit and selenium on common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.) plants. **Photosynthetica** 45:472-476
- Tinker PB (1981) Levels, distribution and chemical forms of trace elements in food plants. **Philos Tr Soc B** 294:41-55

Villela FA, Filho LD, Sequeira EL (1991) Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietilenoglicol 6000 e da temperatura. **Pesq agropec bras** 26:1957-1968

Walker DR, Parrot WA (2001) Effect of polyethylene glycol and sugar alcohols on soybean somatic embryo germination and conversion. **Plant Cell, Tissue and Organ Cult** 64:55-62

Wang C-Q, Xu H-J, Liu T (2011) Effect of selenium on ascorbate-glutathione metabolism during PEG-induced water deficit in *Trifolium repens* L. **J Plant Growth Regul** 30:436-444

Yao X, Chu J, Wang G (2009) Effects of selenium on wheat seedlings under drought stress. **Biol Trace Elem Res** 130:283-290

Zhang J, Liu J, Yang C, Du S, Yang W (2016) Photosynthetic performance of soybean plants to water deficit under high and low light intensity. **South African Journal of Botany** 105:279-287

CONCLUSÕES GERAIS

- O fornecimento de Se via *priming* induziu poucas alterações sobre a fisiologia e o crescimento das plantas, devido à sua diluição nos tecidos, como consequência do acúmulo de biomassa. Dessa forma, é possível que a avaliação em nível de plântulas aponte maiores efeitos do tratamento com Se via *priming*.
- A pulverização com Se incrementou as trocas gasosas e parâmetros de fluorescência da clorofila *a*, sem exercer efeitos sobre o crescimento, pelo fato das plantas terem investido energia na formação de novas folhas. Nesse sentido, pode ser que a repetição da pulverização induza respostas diferenciadas, devido ao favorecimento de maior acúmulo do Se nos tecidos. Recomenda-se, portanto, tanto acompanhar o desenvolvimento das plantas até o final do ciclo, quanto repetir a pulverização em estádios fenológicos específicos, como o florescimento.
- O fornecimento de Se via solução nutritiva foi tóxico sobre o crescimento e a fisiologia das plantas, devido ao seu acúmulo nos tecidos ter gerado estresse oxidativo. Diante dos resultados, recomenda-se quantificar esse estresse por meio de análises bioquímicas, como enzimas do sistema antioxidativo e perfil metabólico, além de investigar os efeitos de doses de Se inferiores a 5 μM .
- Alguns sintomas do déficit hídrico podem ser atenuados em plantas pulverizadas com 80 μM de Se. Nesse sentido, o mecanismo de atuação do Se envolvido na indução de tolerância ao déficit hídrico em plantas de soja, cultivar EMBRAPA 48, está baseado em alterações morfo-anatômicas.
- Não foi possível esclarecer se o fornecimento de PEG induziu aclimatação bioquímica ou supressão do sistema antioxidativo das plantas. Sendo assim, recomenda-se avaliar os efeitos do déficit hídrico em plantas submetidas a um tempo menor de exposição ao PEG.
- Para estudos futuros, recomenda-se investigar os efeitos do fornecimento de Se em plantas de soja cultivadas em solo, tendo em vista que o tratamento com Se via pulverização foi pouco expressivo sobre as raízes das plantas avaliadas nesta pesquisa.