

ALICE CARVALHO DE OLIVEIRA

**PAPEL DO SELÊNIO NO CRESCIMENTO E NA RESPOSTA AO DÉFICIT
HÍDRICO EM TOMATEIRO (*Solanum lycopersicum* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016

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

T

O48p
2016

Oliveira, Alice Carvalho de, 1987-

Papel do selênio no crescimento e na resposta ao déficit hídrico em tomateiro (*Solanumlycopersicum* L.) / Alice Carvalho de Oliveira. – Viçosa, MG, 2016.

xi, 76f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Wagner Luiz Araújo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Solanum lycopersicum* - Efeito do selênio. 2. *Solanum lycopersicum* - Déficit hídrico. 3. Planta - Crescimento.

4. Tomate. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Vegetal. Programa de Pós-graduação em Botânica.

II. Título.

CDD 22. ed.

ALICE CARVALHO DE OLIVEIRA

**PAPEL DO SELÊNIO NO CRESCIMENTO E NA RESPOSTA AO DÉFICIT
HÍDRICO EM TOMATEIRO (*Solanum lycopersicum* L.)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Aprovada: 26 de julho de 2016

AGUSTÍN ZSÖGÖN

Agustín Zsögön

Dimas Mendes Ribeiro

Dimas Mendes Ribeiro
(Coorientador)

Carla Quinhones Godoy Soares

Carla Quinhones Godoy Soares

Marcelo Francisco Pompelli

Marcelo Francisco Pompelli

Wagner Luiz Araújo

Wagner Luiz Araújo
(Orientador)

*“Quando se quer algo verdadeiramente
e com suficiente força, acaba-se por consegui-lo sempre.”*

Herman Hesse

Aos meus irmãos Mariana e Vitor (in memorian)

Ao meu pai Joaquim (in memorian)

Às minhas sobrinhas Júlia e Cecília

Por me ensinarem o que é amor incondicional

Ofereço

*À minha mãe Patrícia e minha vó Maria Júlia pela força
e luta de uma vida inteira, e por terem me ajudado
sempre com algo que nunca nos tiram: a educação.*
Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, por ter me mostrado o valor do ensino superior como fonte libertadora das algemas da ignorância.

À CAPES, pela bolsa concedida.

Ao Departamento de Biologia Vegetal, sempre presente nas minhas conquistas.

Ao meu orientador Prof. Wagner Luiz Araújo, pela orientação, pelo compromisso com meu sucesso, aprendizado e também pela paciência e pelas palavras sempre bem colocadas para que eu pudesse sempre crescer e nunca desistir.

Ao meu coorientador Dimas Ribeiro, pela disponibilidade e ajuda nos momentos que sempre precisei.

Aos membros da banca pelas sugestões e correções do meu trabalho.

À toda equipe da Unidade de Crescimento de Plantas, pela oportunidade desafiadora e toda ajuda, que me levaram a enxergar a grandiosidade do estudo na área vegetal e em grupo.

Aos professores do mestrado: Adriano Nunes Nesi, Aristeia Azevedo, Renata Strozzi João Augusto Meira-Neto, Wagner Otoni, Denise Bazzolli, Humberto Ramos e Maximiller Dal Bianco, pela ajuda no meu crescimento profissional.

Aos meus amigos do laboratório e da vida: William pela ajuda nos experimentos, análises, broncas e risadas e; Rebeca pela ajuda de sempre, ensinamentos, preocupação e amizade sempre sincera; Rina pela amizade e pela paciência com a ajuda na fase final da minha dissertação; Jéssica e Fran pela troca de experiências e cooperação sempre presente; Paula e Elias, por todo carinho. Acácio pelas lindas fotografias, ótimos churrascos e amizade; Vitor por me ensinar a trabalhar com tomate e a não me preocupar com o que não deveria; Carla e Dani, pela amizade e motivação; David, Marcelo, Dora, Luana, Jorge, Jaciara, João, Jonas, Greice, que ajudaram muito com o incentivo de sempre nos momentos difíceis.

Às amigas-irmãs que Viçosa me deu Roberta e Ana Carol, por me lembrarem que a vida também é a arte do encontro; Ao meu amigo Fred Louredo por toda ajuda e atenção.

Às minhas grandes amigas Thais, Nay, Amile, Luila e Raquel, que mesmo distantes, estiveram presentes torcendo para o meu sucesso.

À minha família, que sempre acreditou em mim. E acreditar em alguém é fazê-lo jamais desistir.

BIOGRAFIA

Alice Carvalho de Oliveira, filha de Joaquim Ferreida de Oliveira e Patrícia Carvalho de Oliveira, nasceu na cidade de Coronel Fabriciano, estado de Minas Gerais, no dia 20 de outubro de 1987. Concluiu a graduação em Ciências Biológicas na Universidade Federal de Viçosa em janeiro de 2014, ingressando no Programa de Pós-Graduação em Botânica em agosto do mesmo ano, submetendo-se à defesa de dissertação em 27 de julho de 2016.

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO I.....	4
IMPACTOS DA PRESENÇA DE SELÊNIO NO CRESCIMENTO E TROCAS GASOSAS EM TOMATEIRO (<i>Solanum lycopersicum</i> L.)	4
1. INTRODUÇÃO	5
2. MATERIAL E MÉTODOS	6
2.1. Material vegetal e condições de cultivo	6
2.2. Aplicação do tratamento.....	7
2.3. Aplicação de <i>Se</i> via <i>priming</i>	7
2.4. Análises biométricas	8
2.5. Análises dos parâmetros fotossintéticos e fluorescência da clorofila <i>a</i>	8
2.6. Ensaio bioquímico.....	9
2.7. Extração etanólica	9
2.8. Teor de clorofila.....	10
2.9. Determinação dos teores de aminoácidos totais.....	10
2.10. Determinação do conteúdo de açúcares	10
2.11. Determinação dos conteúdos de malato e fumarato	11
2.12. Determinação dos teores de proteínas solúveis totais	11
2.13. Determinação do conteúdo de amido	11
2.14. Delineamento experimental.....	12
3. RESULTADOS	12
3.1. Avaliação fenotípica de plantas submetidas a diferentes concentrações de Na_2SeO_4 ...	12
3.2. Análises biométricas em plantas submetidas à aplicação direta ao solo de solução de Na_2SeO_4 em diferentes concentrações e período de aplicação.	13
3.3. Avaliação fenotípica de plantas submetidas a diferentes concentrações de Na_2SeO_4 via <i>priming</i> de sementes.....	18
3.4. Plantas submetidas a diferentes concentrações de Na_2SeO_4 via <i>priming</i> de sementes tem crescimento alterado.....	18
3.5. O Selênio não altera os parâmetros de fluorescência e fotossíntese de plantas submetidas a diferentes concentrações de Na_2SeO_4 via <i>priming</i> de sementes	21
3.6. Efeitos do Selênio no metabolismo do Carbono e do Nitrogênio	24
4. DISCUSSÃO.....	26
5. CONCLUSÃO	30
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

CAPÍTULO II	38
APLICAÇÃO DE SELÊNIO VIA <i>PRIMING</i> EM SEMENTES E SEUS IMPACTOS NA RESPOSTA AO DÉFICIT HÍDRICO EM TOMATEIRO (<i>Solanum lycopersicum</i> L.)	38
1. INTRODUÇÃO	39
2. MATERIAL E MÉTODOS	40
2.1. Material vegetal e condições de cultivo	40
2.2. Aplicação do estresse por deficiência hídrica	41
2.3. Determinação do <i>status</i> hídrico da planta	41
2.4. Análises biométricas	42
2.5. Análises dos parâmetros fotossintéticos e fluorescência da clorofila <i>a</i>	42
2.6. Ensaio bioquímico.....	43
2.7. Extração etanólica	43
2.8. Teores de clorofila.....	44
2.9. Determinação dos teores de aminoácidos totais.....	44
2.10. Determinação do conteúdo de açúcares	44
2.11. Determinação dos conteúdos de malato e fumarato	45
2.12. Determinação dos teores de proteínas solúveis totais	45
2.13. Determinação do conteúdo de amido	46
2.14. Determinação das enzimas envolvidas no metabolismo antioxidativo	46
2.15. Determinação do conteúdo de prolina.....	47
2.16. Delineamento experimental.....	48
3. RESULTADOS	48
3.1. Avaliação fenotípica de plantas tratadas com diferentes concentrações de Na ₂ SeO ₄ via <i>priming</i> de sementes submetidas à deficiência hídrica.	48
3.2. Análises biométricas de plantas tratadas com diferentes concentrações de Na ₂ SeO ₄ via <i>priming</i> de sementes submetidas à deficiência hídrica	51
3.3. O Selênio não altera os parâmetros de fluorescência e trocas gasosas em plantas de tomate nem em condições ótimas nem situações de deficiência hídrica.....	54
3.4. Aplicação de Se, via <i>priming</i> em sementes, afeta o metabolismo do Carbono e do Nitrogênio em tomate , sob deficiência hídrica.....	56
3.5. O Se não altera as atividades da APX e CAT em folhas de tomate em condições ótimas e de deficiência hídrica.	59
3.6. O Se não promoveu o acúmulo de prolina em folhas de tomate submetidas a estresse hídrico	61
4. DISCUSSÃO.....	61
5. CONCLUSÃO	65
6. CONCLUSÕES GERAIS	66

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
-------------------------------------	----

RESUMO

OLIVEIRA, Alice Carvalho, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2016. **Papel do Selênio no crescimento e na resposta ao déficit hídrico em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.).** Orientador: Wagner Luiz Araújo. Coorientador: Dimas Mendes Ribeiro.

Apesar do conhecido papel positivo do Selênio (*Se*) no crescimento de plantas e na atenuação dos danos ocasionados por estresses abióticos, pouco parece ter sido ainda explorado acerca dos impactos fisiológicos e metabólicos de distintos níveis de *Se* aplicados via *priming* em sementes de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Propõe-se então, neste trabalho, uma pormenorizada caracterização fisiológica e metabólica em tomateiro cultivados em presença de *Se* ou metabolicamente induzidas via *seed priming*, em condições ótimas e de déficit hídrico. Para tal, foram realizadas análises biométricas, com foco na altura e incremento de biomassa, bem como medições de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*, e análises bioquímicas referentes ao metabolismo do carbono e nitrogênio. Em condições de seca, além das análises anteriormente citadas, um acompanhamento do *status* hídrico das plantas, assim como análises referentes ao metabolismo antioxidativo foram realizadas. Os resultados aqui obtidos mostram que, em presença de *Se*, as plantas tem seu crescimento alterado, porém estas alterações não estão associadas a alterações fotossintéticas, fotoquímicas, ou do sistema antioxidativo, ocorrendo, predominantemente, às expensas de um reajuste metabólico verificado por aumentos significativos no conteúdo de fumarato, acoplados à diminuição dos níveis de proteína e aminoácidos. Essa modulação específica do metabolismo mitocondrial, com aumento nos níveis deste ácido orgânico, parece possibilitar tanto a manutenção do crescimento, durante o processo de aclimação à presença de altas dosagens de *Se*, bem como na resposta à seca. Em conjunto, os resultados aqui obtidos oferecem novas perspectivas para a compreensão do efeito do *Se* no metabolismo vegetal em condições ótimas, como também em condições de déficit hídrico.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Alice Carvalho, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2016. **Role of Selenium on both growth and drought response in tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.).** Advisor: Wagner Luiz Araújo. Co-advisor: Dimas Mendes Ribeiro.

Despite the recognized positive role of selenium (*Se*) on both plant growth and mitigation of effects caused by abiotic stresses, our knowledge concerning the physiological and metabolic impacts of *Se* applied via priming on tomato (*Solanum lycopersicum*) seeds remains rather fragmented. Here, a detailed physiological and metabolic characterization of tomato cultivated either in presence of *Se* or metabolically induced via seed priming was performed under both optimal growth conditions and following water restriction. To this end, biometric analyzes, focusing on increments in both plant height and biomass were performed. In addition, gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence measurements coupled with biochemical analyzes of carbon and nitrogen metabolism were investigated. Following drought conditions, in addition to the aforementioned analysis, plant water status was monitored, as well as analysis on the anti-oxidative metabolism. Our results demonstrated that in presence of *Se* there is a clear alteration in plant growth. Notably, these changes are neither associated with photosynthetic changes nor with alteration in photochemical efficiency or antioxidative system; however, those changes seem to occur mainly at the expense of a metabolic adjustment explained by the increases in fumarate content, coupled with decreased levels of both protein and amino acids. This specific modulation of mitochondrial metabolism seems to facilitate the maintenance of growth, during the acclimation to the presence of high doses of *Se*, and act in response to drought in plants in which seeds were treated with *Se*. Together, our findings present novel perspectives for enhancing our understanding of the effects of *Se* in plant metabolism under optimal conditions as well as following water limitation.

INTRODUÇÃO GERAL

O selênio (*Se*) é um elemento traço natural da crosta terrestre (Mehdawi, 2012) e, assim como os demais elementos, apresenta um ciclo biogeoquímico que compreende a sua evaporação a partir de oceanos, solos e plantas e/ou sedimentação de partículas (Prauchner, 2014). O *Se* está disponível na natureza em diferentes formas inorgânicas, tais como: Se^0 (elementar), Se^{2-} (seleneto), HSeO_3^{2-} (tioselenato), SeO_4^{2-} (selenato) e SeO_3^{2-} (selenito), sendo as duas últimas preferencialmente absorvidas pelas plantas (Sors *et al.*, 2005). Após sua absorção o *Se* entra na cadeia alimentar, sendo então transferido à dieta humana através de produtos de origem animal e vegetal (Rayman, 2008). No solo, a disponibilidade do *Se* é regulada por parâmetros geoquímicos, como pH e estado redox, ou ainda pelo conteúdo de óxidos de ferro (Fe) e alumínio (Al), atividade microbiana, teor de matéria orgânica e argila, além da competição com outros elementos químicos (Barillas *et al.*, 2011; Mehdi *et al.*, 2013). Não obstante, propriedades físicas do solo como grau de compactação, aeração e disponibilidade hídrica podem, de certa forma, influenciar no transporte de *Se* para as raízes (Prauchner, 2014).

O conteúdo de *Se* nos solos é altamente variável, encontrando-se valores como 0,005 mg Kg^{-1} em certas áreas da China até valores como 8.000 mg Kg^{-1} em solos seleníferos na Rússia. É importante mencionar também que cerca de 1 bilhão de pessoas vive em regiões com solos deficientes em *Se* (Mora *et al.*, 2015). Em conjunto, essas informações indicam que tanto a toxidade quanto a deficiência do *Se* apresentam-se como problemas de ocorrência mundial (Zhu *et al.*, 2009). Em humanos, deficiências em *Se* estão comumente associadas a diversas patologias como hipertireoidismo, doenças cardiovasculares, enfraquecimento do sistema imunológico, infertilidade masculina, declínio cognitivo, e aumento na suscetibilidade a distintos tipos de câncer (Diwadkar-Navsariwala *et al.*, 2006; Fairweather-tait *et al.*, 2011). Em adição, o excesso de *Se*, a selenose, pode ocasionar diversos malefícios à saúde humana que variam desde dermatites à falência renal e infarto do miocárdio (White, 2015). Cumpre mencionar que o *Se*, além de essencial para muitos organismos incluindo mamíferos, bactérias e certas algas (Fu *et al.*, 2002; Novoselov *et al.*, 2002; White e Brown, 2010; Mora *et al.*, 2015) é tóxico em altas concentrações. Uma das características que tornam o *Se* fundamentalmente essencial para alguns organismos é a sua incorporação à selenocisteína (SeCys) nas chamadas selenoproteínas, que apresentam funções antioxidantes (Barillas *et al.*, 2011).

As selenoproteínas já foram identificadas tanto em mamíferos quanto em eucarióticos unicelulares (Lobanov *et al.*, 2007), o que sugere uma ancestralidade comum para a presença dessas proteínas. Ademais, muitas dessas selenoproteínas parecem ter sido preservadas em vertebrados, algas verdes e uma variedade de protistas. Em contraste, plantas terrestres, fungos, nematóides, insetos e alguns unicelulares eucarióticos perderam, em eventos independentes ao longo da evolução, a presença das selenoproteínas ou até mesmo todos os vestígios de sua utilização (Lobanov *et al.*, 2007; Zhang e Gladyshev, 2011).

Apesar de não ser essencial às plantas, o *Se* pode conferir diversos benefícios fisiológicos aos vegetais incluindo aumentos no crescimento (Hartikainen *et al.*, 2000) atraso na senescência (Xue *et al.*, 2001; Djanaguiraman *et al.*, 2004). Não obstante, a presença de *Se* parece promover diminuição dos danos causados por estresses vários como deficiência hídrica (Yao *et al.*, 2009; Hasanuzzaman e Fujita 2011; Nawaz *et al.*, 2013; Ahmad *et al.*, 2015), metais pesados (Ghoraba *et al.*, 2015; Pandey e Gupta, 2015; Qing *et al.*, 2015) como, por exemplo, cádmio (Pedrero, 2008; Filek, 2008), temperatura (Djanaguiraman *et al.*, 2004; Hawrylak-nowak e Matraszek, 2010), além de auxiliar na proteção contra infecções causadas por fungos e herbívoros (Hanson *et al.*, 2003) e tolerância ao estresse fotooxidativo (Seppänen *et al.*, 2003). Adicionalmente, o *Se* participa do sítio ativo da enzima antioxidante peroxidase da glutathione (GDH-PX) (Rotruck *et al.*, 1973), destacando sua importância na defesa contra espécies reativas de oxigênio (EROs) (Flohe *et al.*, 1973; Rotruck *et al.*, 1973; Hasanuzzaman e Fujita, 2011). Não somente a peroxidase da glutathione GDH-PX, mas também as enzimas dismutase do superóxido (SOD), peroxidase do ascorbato (APX) e catalase parecem ter a sua ação beneficiada pela presença de *Se* (Hasanuzzaman e Fujita, 2011). Nesse contexto, o *Se* também age como cofator na rota biossintética da redutase da glutathione potencializando, dessa forma, o processo de detoxificação de EROs (Djanaguiraman *et al.*, 2010).

Além de acumular *Se* nos seus tecidos, as plantas podem também volatilizar esse elemento, disponibilizando-o na atmosfera. Tal característica torna viável o cultivo de culturas capazes de reduzir os níveis de *Se* tanto nos solos quanto em águas residuais da agricultura e da indústria, mediante volatilização do *Se* (Hansen *et al.*, 1998; Line Terry, 2003). Assim, muitos esforços têm sido envidados buscando maior compreensão e a possibilidade de manipulação do metabolismo de *Se* em plantas. Por exemplo, a primeira enzima da via de assimilação do selenato, a ATP sulfurilase foi superexpressa

em *Brassica juncea*, resultando em maior tolerância ao *Se* e na sua acumulação, através de uma redução mais significativa de selenato a *Se* orgânico (Zhu, 1999). Por outro lado, a superexpressão da cistationa- γ -sintase (Cys), a primeira enzima que regula a conversão de *Se* a selenocisteína (SeCys) culminou em maior tolerância a partir de aumentos na volatilização (Van Huysen *et al.*, 2003). Em conjunto, as informações descritas acima ressaltam a importância das pesquisas voltadas ao metabolismo do *Se* em plantas, uma vez que o sistema solo-plantas representa a principal fonte de *Se* para a nutrição de humanos e animais (Govasmark e Salbu, 2011). Sendo assim, ao absorverem e acumularem o *Se* em seus tecidos, as plantas podem servir de fonte de *Se* à alimentação de animais e humanos (Barillas *et al.*, 2011), e ainda terem seu crescimento e tolerância a diversos estresses beneficiados.

Em resumo, a manipulação do metabolismo de *Se* em plantas, buscando tanto a obtenção de indivíduos com maior número de características favoráveis para a fitorremediação, via fito-extração e fito-volatilização, quanto com aumento na tolerância a altos níveis de *Se* (Barillas *et al.*, 2011), torna-se altamente atrativa atualmente. Contudo, para se explorar os impactos ecofisiológicos do *Se*, assim como seu efeito no aumento da tolerância a estresses vários, é fundamental conhecer os impactos metabólicos do *Se* em diferentes espécies de plantas. Cumpre mencionar, portanto, a corrente necessidade de se aumentarem as pesquisas que possibilitem uma melhor compreensão dos impactos gerais da presença do *Se* e as vias pelas quais esse elemento é metabolizado. Diante do exposto, propõe-se aqui uma pormenorizada caracterização fisiológica e metabólica em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) cultivados em presença de *Se* ou metabolicamente induzidas via *seed priming* durante limitação hídrica. Busca-se, portanto, uma melhor compreensão da influência do *Se* no crescimento, desenvolvimento e metabolismo, tanto na ausência quanto na presença de fatores causadores de estresse. Para tanto, dois trabalhos independentes, porém complementares foram realizados. No primeiro buscou-se investigar os efeitos da presença de *Se* no crescimento e metabolismo em tomate quando aplicados diretamente no solo ou via *priming* em sementes. No segundo, os impactos do *priming* em sementes, mediante tratamento com dosagens distintas de *Se*, foram investigados em tomateiro submetidos ao déficit hídrico. Os resultados ora obtidos são discutidos no contexto dos modelos atualmente aceitos de regulação do crescimento e aclimação metabólica em resposta a limitações na disponibilidade hídrica.

CAPÍTULO I
IMPACTOS DA PRESENÇA DE SELÊNIO NO CRESCIMENTO E TROCAS
GASOSAS EM TOMATEIRO (*Solanum lycopersicum* L.)

1. INTRODUÇÃO

Deficiências de Selênio (*Se*) em humanos podem levar a diversos problemas de saúde, que vão desde a infertilidade masculina e infecções virais a uma maior suscetibilidade a diversos tipos de câncer (Diwadkar-Navsariwala *et al.*, 2006). Cumpre mencionar que esses problemas podem ser aliviados mediante o uso de plantas capazes de metabolizar ou mesmo armazenar esse elemento em seus tecidos, através da biofortificação agronômica. Essa técnica consiste, basicamente, no acúmulo de micronutriente nos vegetais, através do melhoramento, engenharia genética ou uso de fertilizantes (Yuan *et al.*, 2015).

Fertilizantes à base de selenato de sódio (Na_2SeO_4) são os mais utilizados para a biofortificação com *Se*. Esse tipo de fertilização pode ocorrer com aplicações diretas ao solo, via *spray* foliar ou *priming* em sementes (Ahmad *et al.*, 2015). Em sementes, o *priming* consiste na hidratação controlada capaz de promover atividades metabólicas antes mesmo da protusão da radícula (Nawaz *et al.*, 2013), podendo ser realizado a partir da imersão das sementes em soluções contendo compostos naturais e/ou sintéticos (Jisha *et al.*, 2013). O *priming* em sementes caracteriza-se por ser fácil, prático e de baixo custo, sendo considerado um mecanismo promissor para o aumento dos níveis de *Se* em culturas de interesse agronômico (Ahmad *et al.*, 2015). Em adição, evidências demonstram que o *priming* em sementes, com uso de soluções contendo *Se*, parece também uma abordagem eficaz para melhorar a tolerância de plantas frente a diversos estresses ambientais (Nawaz *et al.*, 2013), provavelmente em função de alterações metabólicas variadas. Assim, os níveis de aminoácidos livres, açúcares totais e solúveis aumentaram em plântulas de arroz (*Oriza sativa*) submetidas ao *priming* com *Se* (Khaliq *et al.*, 2015). Nesse contexto, plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) cujas sementes foram previamente imersas em solução de selenato de sódio apresentaram aumentos no comprimento da parte aérea, número de folhas e raízes secundárias (Nancy e Arulselvi, 2014). Não obstante, o crescimento vegetal parece ser amplamente favorecido devido ao tratamento via *priming* em sementes com *Se* (Khaliq *et al.*, 2015).

O *Se* é um microelemento de notável importância no metabolismo antioxidante tanto em seres humanos (Watts, 1994; Mehdi *et al.*, 2013) quanto em plantas (Xue *et al.*, 2001). Não obstante, os impactos desse micronutriente no metabolismo vegetal não foram ainda completamente elucidados, uma vez que efeitos antagônicos com relação à sua concentração têm sido evidenciados. Com efeito, em baixas a moderadas

concentrações, o *Se* age como um antioxidante, estimulando o crescimento e desenvolvimento; porém, em concentrações elevadas age como pró oxidante (Hartikainen *et al.*, 2001) e ocasionando efeitos tóxicos (Hamilton, 2004), refletidos na redução do crescimento (Xue *et al.*, 2001). Não somente os impactos do *Se* no mecanismo antioxidativo, mas também sua interferência na assimilação do carbono (C) e nitrogênio (N) (Ghosh *et al.*, 2013) parecem explicar, ao menos parcialmente, as alterações no crescimento vegetal. Em adição, acúmulo de amido nos cloroplastos, principal sítio de metabolização tanto do *Se* quanto do amido (Pennanen *et al.*, 2002), em resposta a presença de *Se*, apresentam-se como potencial explanação para os impactos desse nutriente no crescimento vegetal.

Verifica-se, contudo, que importantes questões sobre como o metabolismo primário e o crescimento vegetal são afetados pela presença de *Se* não são ainda completamente entendidas. Para tal, o objetivo deste trabalho foi verificar as possíveis alterações no crescimento de tomateiro em função da fertilização com *Se* através de aplicações diretas ao solo, e consequentemente determinar as dosagens ótimas e as prejudiciais ao crescimento. A partir daí, foi feito o *priming* em sementes com *Se*, com o intuito de se investigar as implicações deste tratamento no crescimento, metabolismo primário e trocas gasosas em plantas de tomate em condições ótimas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e condições de cultivo

O experimento foi realizado em casa-de-vegetação, na Universidade Federal de Viçosa (20° 45'S, 42° 15' W), Viçosa, Minas Gerais. Sementes de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Santa Clara) foram germinadas em placa de Petri (15 cm de diâmetro), contendo papel do tipo germiteste umedecido com água destilada. As placas foram acondicionadas em câmara de crescimento do tipo BOD (Forma Scientific, Inc, Ohio, EUA), sob fotoperíodo de 12/12 horas (dia/noite), temperatura 25/16 °C (dia/noite), umidade relativa 65 ± 5 % e intensidade de luz durante o período luminoso de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, por um período de sete dias. Após a emissão da radícula, as plântulas foram então transferidas, diariamente, para bandejas contendo substrato comercial Tropstrato HT® para hortaliças e permaneceram nas câmaras de crescimento até expansão das folhas cotiledonares. Os vasos foram conduzidos à casa de vegetação e, após o aparecimento de duas folhas completamente expandidas, as plântulas foram transplantadas para vasos plásticos de 3,5 L. O substrato comercial utilizado era o

Tropstrato HT® e recebeu adubação de 15 g NPK granulado 4:14:8 (equivalente a 4% de $(\text{NH}_4)^+(\text{NO}_3)^-$, 14% de P_2O_5 , 8% de K_2O) por vaso. A irrigação foi realizada diariamente a fim de manter-se a umidade do substrato dos vasos próxima à capacidade de campo.

2.2. Aplicação do tratamento

1° Experimento

Após 14 dias de transplântio, as plantas foram submetidas à aplicação de 200 mL de solução de selenato de sódio (Na_2SeO_4), via aplicação direta ao solo, nas seguintes concentrações: 5, 10, 25, 50, 75, 100 e 150 μM . Outras duas aplicações ocorreram no 17° e 20° dias após o transplântio de forma análoga à primeira. O material vegetal para análises biométricas foi coletado no 28° dia após o transplântio, totalizando duas semanas de tratamento com *Se*.

2° Experimento

Após 7 dias de transplântio, as plantas foram submetidas à aplicação de 200 mL de solução de Na_2SeO_4 nas seguintes concentrações: 5, 10, 25, 50, 75, 100 e 250 μM . Outras duas aplicações ocorreram nos 10° e 13° dias após o transplântio de forma análoga à primeira. O material vegetal para análises biométricas foi coletado no 21° dia após o transplântio, totalizando duas semanas de tratamento com *Se*.

2.3. Aplicação de *Se* via *priming*

A partir da análise comparativa dos efeitos observados após as aplicações dos tratamentos descritos acima, duas dosagens de *Se* foram selecionadas para a aplicação via *priming*. Além das dosagens de 25 e 250 μM de selenato de sódio, sementes foram também imersas em água destilada, para que se pudesse atribuir os efeitos observados ao *Se* e não somente ao condicionamento fisiológico. Adicionalmente, plantas cujas sementes não passaram pelo condicionamento via *priming* também foram avaliadas, com o intuito de servirem como parâmetros de condições normais. O *priming* em sementes foi feito a partir da imersão das sementes em solução de selenato de sódio (Na_2SeO_4 , Sigma Aldrich) em duas concentrações previamente estabelecidas (25 μM e 250 μM). As sementes foram acondicionadas em tubos do tipo Falcon, dispostos verticalmente sob temperatura ambiente por 24 horas. Após esse período, a solução foi descartada, e o excesso retirado com auxílio de papel toalha. Em seguida, as sementes

foram transferidas para placas de Petri, acondicionadas em câmara de crescimento, e posteriormente transferidas para casa de vegetação, como descrito no item 2.1.

2.4. Análises biométricas

Os parâmetros de crescimento analisados foram: altura, massa seca da parte aérea (folhas e caule), massa seca da raiz, área foliar total e área foliar específica. Após a coleta, as amostras foram imediatamente levadas à estufa com ventilação forçada a 65 °C para obtenção da massa seca (MS) após peso constante. O crescimento das plantas foi monitorado a cada dois dias. Para tanto, a altura das plantas foi quantificada com auxílio de uma régua milimétrica desde a altura do colo até a gema apical durante todo o experimento. Para a determinação da área foliar específica (AFE), nove discos foliares de 14,1 cm² foram secos em estufa a 65 °C. A área foliar total (AFT) foi estimada a partir da AFE utilizando a massa seca de todas as folhas. A determinação de ambas AFE e AFT foi realizada seguindo protocolo descrito (Mielke *et al.*, 1995). A AFE foi calculada utilizando a fórmula:

$$AFE (cm^2 g^{-1}) = \frac{\text{área foliar dos discos (cm}^2\text{)}}{\text{massa seca dos discos (g)}}$$

2.5. Análises dos parâmetros fotossintéticos e fluorescência da clorofila *a*

A taxa de assimilação líquida do carbono (A , CO₂ μmol m⁻² s⁻¹), a condutância estomática ao vapor de água (g_s , mol H₂O m⁻² s⁻¹), a taxa de transpiração foliar (E), a concentração interna de CO₂ (C_i , μmol CO₂ mol⁻¹), bem como a externa (C_a μmol CO₂ mol⁻¹) foram medidas simultaneamente aos parâmetros de fluorescência da clorofila *a*, no primeiro folíolo da terceira folha, contada a partir do ápice. Para tal utilizou-se um analisador de gases a infravermelho em sistema aberto (IRGA – *Infrared Gas Analyzer*), dotado de uma câmara de área amostral de 2 cm², modelo LI 6400XT (LI-COR, Lincoln, NE, EUA), com fluorômetro acoplado (LI-6400-40, LI-COR Inc.). As medições foram realizadas entre 8:00 e 12:00 horas, sob irradiância de 1000 μmol de fótons m⁻² s⁻¹, condição padrão de CO₂ de 400 ppm e sem controle da temperatura da câmara do IRGA. A quantidade de luz azul aplicada foi de 10% da densidade do fluxo fotossintético para maximizar a abertura estomática. A respiração no escuro (R_d) foi determinada durante o período de escuro (entre 21:00 e 01:00 h) utilizando-se o mesmo equipamento descrito acima.

Para a determinação da fluorescência da clorofila *a* foi utilizado um fluorômetro acoplado ao IRGA no mesmo momento de medição da R_d . O folíolo foi inicialmente submetido a um pulso de luz vermelho-distante ($1-2 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), para a determinação da fluorescência inicial (F_0). Em seguida, para a estimativa da fluorescência máxima emitida (F_m) foi aplicado um pulso de luz saturante, com irradiância de $6000 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e duração de 1 s. A fluorescência mínima de folhas adaptadas à luz (F_0') e a fluorescência máxima da clorofila (F_m') foram determinadas utilizando o mesmo equipamento concomitantemente à coleta dos dados de trocas gasosas. A eficiência fotoquímica máxima do FSII (F_v/F_m), a eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos do FSII (F_v'/F_m'), os coeficientes de extinção fotoquímica (q_L) e não-fotoquímica (NPQ) e a taxa de transporte de elétrons (ETR) foram estimados conforme DaMatta e Rena (2002).

2.6. Ensaios bioquímicos

As folhas previamente utilizadas para as análises de trocas gasosas e fluorescência (conforme descrito no tópico 2.5) foram coletadas para os ensaios bioquímicos. Todo o material vegetal foi coletado e rapidamente congelado em nitrogênio líquido e, em seguida, armazenado a -80°C para análises posteriores.

2.7. Extração etanólica

Alíquotas de aproximadamente 25 mg de massa fresca foram maceradas em nitrogênio líquido e posteriormente submetidas à extração etanólica, a quente, pela adição de 250 μL de álcool etílico 98% aos microtubos de 1,5 mL contendo o material macerado. As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 20 min a 80°C sob agitação de 822 g. Após esse período os microtubos foram centrifugados a 17.000 g por 10 min a temperatura de 4°C . O sobrenadante foi coletado e armazenado em um novo tubo de 1,5 mL. O precipitado resultante foi submetido a outras duas extrações utilizando álcool etílico 80% e 50% seguindo o mesmo procedimento descrito acima. Os sobrenadantes obtidos nestas etapas foram colocados no mesmo microtubo sendo então separados do precipitado resultante, porém ambos foram armazenados a -20°C para análises posteriores.

2.8. Teor de clorofila

Os teores de clorofila das folhas foram determinados no extrato etanólico conforme Porra *et al.*, (1989), com a utilização de um leitor de microplacas (Opit Max Tunable Microplate Reader), em absorvância de 645 e 665 nm. De posse dos resultados das absorvâncias foram calculados os teores de clorofila *a* e *b*, conforme as equações abaixo:

$$\text{Clorofila } a = 5,21 * \text{Abs665} - 2,07 * \text{Abs645}$$

$$\text{Clorofila } b = 9,29 * \text{Abs645} - 2,74 * \text{Abs665}$$

E os teores de clorofilas totais foram normalizados pela massa fresca das amostras.

2.9. Determinação dos teores de aminoácidos totais

O conteúdo de aminoácidos totais foi quantificado de acordo com (Gibon *et al.*, 2004). Para tanto, em uma microplaca adicionou-se 15 µL do extrato etanólico, 35 µL de etanol 70%, 50 µL de tampão citrato pH 5,2 acrescido de ácido ascórbico 0,2 % (p/v) e 100 µL de ninhidrina 1% (p/v) em etanol 70% (v/v), em cada poço. A microplaca foi incubada no escuro por 20 min a 95 °C e centrifugada por 15 segundos a 17,000 g. Posteriormente, foi feita a leitura da placa no comprimento de onda de 570 nm. Para a determinação de aminoácidos totais fez-se a curva de calibração utilizando leucina como padrão. Os dados obtidos foram expressos em µmol g⁻¹ de MF.

2.10. Determinação do conteúdo de açúcares

Os teores de glicose, frutose e sacarose foram determinados segundo metodologia descrita previamente (Fernie *et al.*, 2001). Para a reação foi preparada uma mistura (meio de reação) contendo tampão HEPES/KOH 100 mM com MgCl₂ 30 mM pH 7, ATP 118 mM, NADP⁺ 48,4 mM, e 56 unidades de desidrogenase da glicose-6-fosfato - G6PDH (5 mg ml⁻¹). Foram adicionados em cada poço de uma microplaca 160 µL do *mix*, 15 µL do extrato e 35 µL de etanol 80%. As leituras cinéticas das absorvâncias foram feitas a 340 nm, com intervalos de um minuto entre elas. Após a estabilização da densidade ótica, adicionou-se 5 µL das seguintes enzimas: hexocinase (1,5 U por reação), fosfoglicose isomerase (0,7 U por reação) e invertase (5 U por reação) com intervalos de 20 minutos entre cada aplicação. Os resultados expressos em µmol g⁻¹ foram estimados segundo equação baseada na lei de Lambert-Beer:

$$\mu\text{mol g}^{-1} \text{ NADPH} = \frac{\Delta\text{OD}}{(2,85 * 6,22)}$$

2.11. Determinação dos conteúdos de malato e fumarato

Os conteúdos de malato e fumarato foram determinados a partir da metodologia descrita por Nunes-Nesi *et al.* (2007). Para a reação foi preparada uma mistura (meio de reação) contendo 50 μL de tampão Tricina/KOH 0,2 M com MgCl_2 10 mM pH 9,0, 10 μL de brometo de metiltiazolildifeniltetrazólio - MTT (10 mM), 10 μL de NAD^+ (60 mM), 2 μL de fenazinaetosulfato - PES (20 mM), 5 μL de Triton X-100 10% (v/v), 3 μL de H_2O . Em uma microplaca adicionou-se 80 μL do meio de reação juntamente a 10 μL do extrato etanólico e 10 μL de ETOH a 98%. As leituras foram feitas a partir de um leitor de microplacas a 570 nm, com intervalo entre leituras de um minuto. Uma vez estabilizado a densidade ótica, foram adicionados sucessivamente aos poços 5 μL de malato desidrogenase (1 U por reação) e, após nova estabilização da OD, 5 μL de fumarase (0,1 U por reação). Para obtenção dos resultados, expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ de MF, foi feita uma curva de calibração para malato e fumarato.

2.12. Determinação dos teores de proteínas solúveis totais

O conteúdo de proteínas solúveis totais foi determinado conforme previamente descrito (Gibon *et al.*, 2004) utilizando-se o precipitado resultante da extração etanólica. A fração insolúvel em etanol foi ressuspensa em 400 μL de NaOH 0,1 M e então homogeneizada com o auxílio de um vortex. Os microtubos foram incubados por uma hora a 95 °C sob agitação de 21,023 g. Após, os microtubos permaneceram em gelo durante 5 minutos para cessar a reação de extração a quente. Uma alíquota de 5 μL do sobrenadante foi então retirada dos microtubos e adicionada a microplaca já contendo 180 μL da solução de Bradford (diluição 1:5 do reagente) em cada poço. O comprimento de onda utilizado para leitura pontual da microplaca foi de 595 nm. O resultado foi obtido a partir de curva de calibração em que se utilizou albumina sérica bovina (BSA) como padrão, sendo posteriormente expresso em mg g^{-1} MF.

2.13. Determinação do conteúdo de amido

A concentração de amido foi determinada a partir da metodologia descrita por Fernie *et al.*, (2001), a partir do mesmo extrato utilizado para quantificação de proteínas (precipitado resultante da extração etanólica mais NaOH 0,1 M). Para neutralização do extrato utilizado foi adicionado 70 μL de ácido acético 1 M, seguindo-se de vigorosa homogeneização. Foi preparado uma mistura (*mix* de reação) para a hidrólise do amido

contendo as enzimas amiloglicosidase (0,14 unidades μL^{-1}) e α -amilase (0,01 U μL^{-1}) ressuspensas em acetato de sódio 0,5 M pH 4,9. Em cada poço de uma microplaca, contendo 40 μL da suspensão feita a partir do precipitado da extração etanólica, foi adicionado 60 μL do *mix* de hidrólise do amido. A microplaca foi vedada com fita de alumínio (3M Modelo 425®) e então incubada por uma hora a 56°C com leve agitação. Posteriormente, a microplaca seguiu para centrifugação de 15 segundos a 17000 g, e então foram retirados 25 μL da suspensão e transferidos para uma segunda microplaca contendo 165 μL do meio de reação composto por tampão Hepes/KOH 1M pH 7,0 MgCl₂ 3 mM, ATP 118 mM, NADP⁺ 48,4 mM e 56 unidades de desidrogenase da glicose-6-fosfato– G6PDH (0,7 unidades μL^{-1}). A determinação dos teores de glicose (amido hidrolisado) foi realizada com o uso de um leitor de microplacas, com leitura a 340 nm, com intervalos de 1 minuto entre as leituras. Após a estabilização da densidade ótica, 5 μL de hexocinase (2 unidades por reação). O conteúdo de amido foi então calculado de acordo com a equação utilizada para a determinação de glicose e os resultados expressos em μmol de glicose por g^{-1} de MF.

2.14. Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com seis repetições para cada tratamento, sendo cada unidade experimental composta por uma planta por vaso. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, para verificar diferenças estatísticas entre os tratamentos, as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($P < 0,05$), com auxílio do software Assistat® (Silva e Azevedo, 2002).

3. RESULTADOS

3.1. Avaliação fenotípica de plantas submetidas a diferentes concentrações de Na_2SeO_4

Pequenas variações nos fenótipos foram observadas em plantas recebendo doses distintas de selenato, revelando uma tendência de maior comprimento da parte aérea para as plantas que receberam aplicação de 25 μM de Na_2SeO_4 (Figura 1). Tal comportamento foi observado tanto em relação ao controle quanto em relação às demais concentrações de selenato aqui utilizadas. Diferenças visuais aparentes na coloração e na morfologia foliar não foram observadas entre as plantas submetidas a diferentes dosagens (Figura 1). É importante mencionar também que sintomas de toxicidade do *Se*,

como por exemplo, a clorose (Hartikainen *et al.*, 2000), não foram observados nem mesmo nas plantas tratadas com as maiores concentrações de selenato.

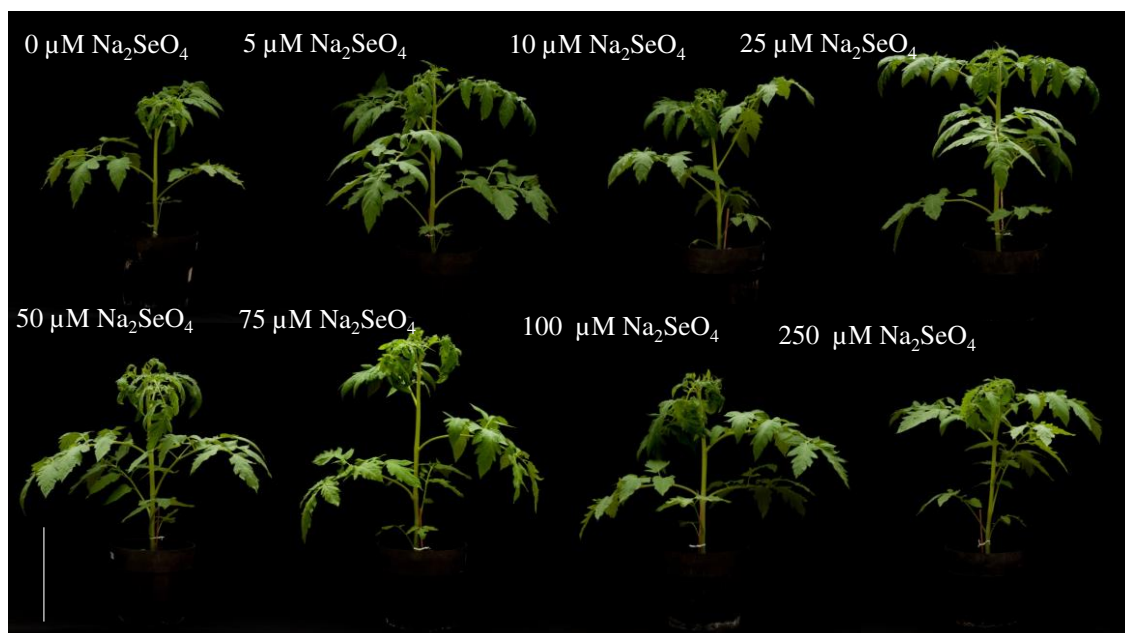


Figura 1. Imagens representativas de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv. Santa Clara). Fotos foram obtidas com plantas aos 21 dias após o transplantio. Durante as aplicações que ocorreram no 7°, 10° 13° dias após o transplantio, as plantas foram submetidas ao tratamento com diferentes concentrações de solução de Na_2SeO_4 . Traço em branco representa a escala (17 cm).

3.2 Análises biométricas em plantas submetidas à aplicação direta ao solo de solução de Na_2SeO_4 em diferentes concentrações e período de aplicação.

1° experimento

Dentre os parâmetros de crescimento avaliados, a massa seca das folhas (MSF), massa seca do caule (MSC) e massa seca total (MST) apresentaram comportamento similares. Entretanto, Apesar de não se observarem diferenças estatísticas, observa-se uma tendência de incremento nesses parâmetros em plantas cultivadas em presença de 25 μM de selenato, assim como uma tendência de diminuição nesses parâmetros em plantas controle (0 μM de Na_2SeO_4) ou quando cultivadas com 100 μM de selenato (Figura 2).

A massa seca radicular (Figura 2E) também apresenta tendência de incrementos em plantas cultivadas com 25 μM de selenato. A razão entre massa radicular e da parte aérea (Figura 2D) foi maior para plantas tratadas com 75 μM de selenato em relação às

plantas tratadas com 100 μM . A alocação de biomassa no caule foi maior em plantas controle em comparação àquelas cultivadas com 75 e 100 μM . A alocação de biomassa nas raízes de plantas cultivadas com 100 μM de selenato foi maior que nas cultivadas com 50 e 75 μM (Figura 2F).

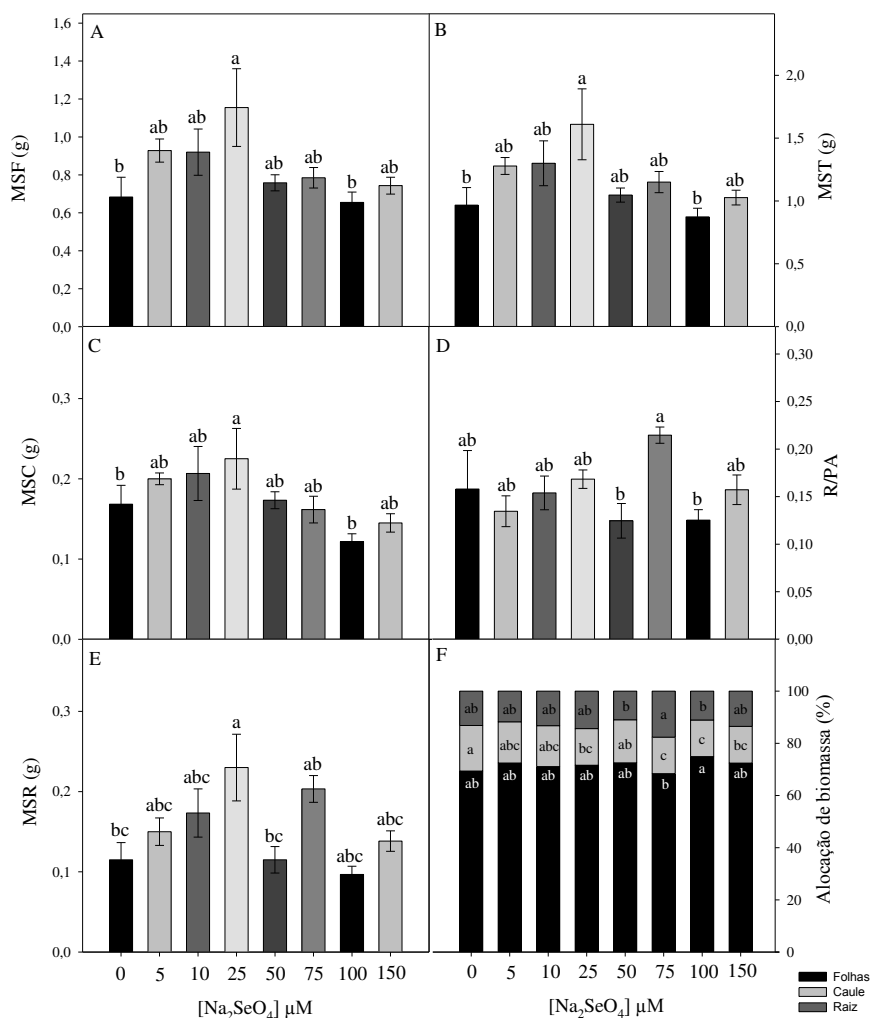


Figura 2. Variação dos parâmetros biométricos referentes à massa seca em resposta ao tratamento com diferentes concentrações de selenato de sódio em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv. Santa Clara) com 28 dias. Aplicações de Na_2SeO_4 ocorreram nos 14°, 17° e 20° dias após o transplântio, e coleta no 28°. Massa seca das folhas (MSF) (A); massa seca total (MST) (B); massa seca do caule (MSC) (C); Razão entre raiz e parte aérea (R/PA) (D); massa seca da raiz (MSR) (E); alocação de biomassa (F). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si segundo o teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Plantas tratadas com 25 μM de Na_2SeO_4 apresentaram maior altura final em relação àquelas tratadas com 100 μM (Figura 3A). O mesmo ocorre para a taxa de crescimento relativo em altura (Figura 3B) e área foliar total (Figura 3C).

Diferentemente da área foliar total, a área foliar específica (AFE) (Figura 3D) foi maior em plantas suplementadas com 100 μM de Na_2SeO_4 em relação às suplementadas com 0, 5, 10, 25 e 50 μM , e estatisticamente similar aos tratamentos com 75 e 150 μM de selenato.

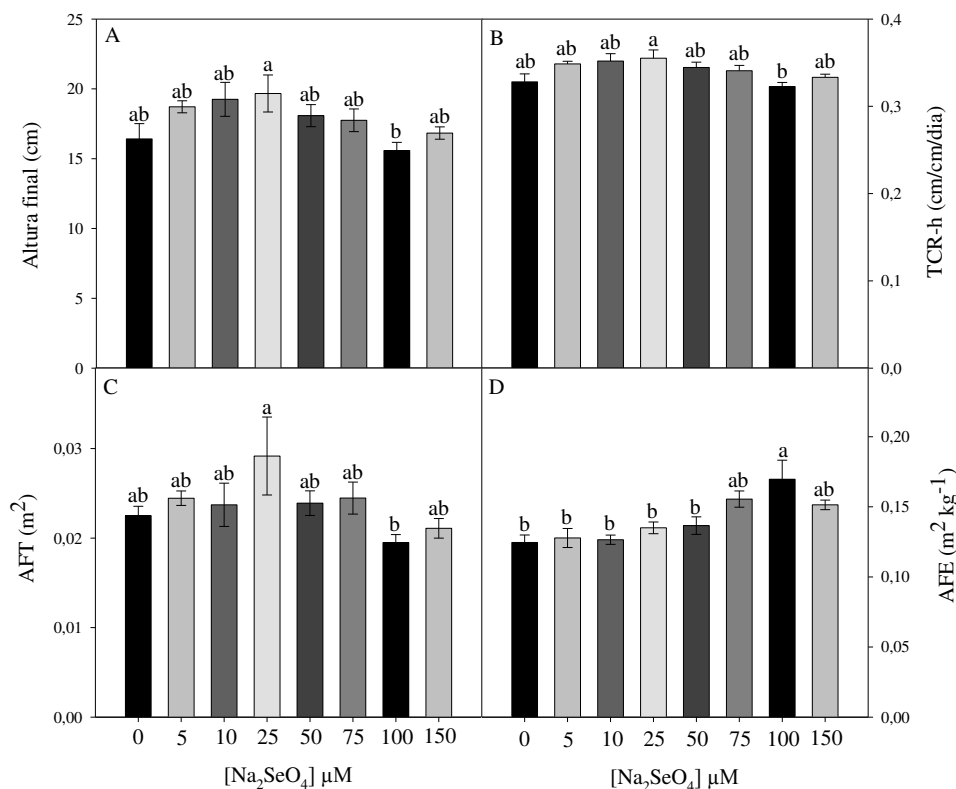


Figura 3. Variação nos parâmetros biométricos referentes à altura e área foliar em resposta ao tratamento com diferentes concentrações de selenato de sódio em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv. Santa Clara) com 28 dias. Aplicações de Na_2SeO_4 ocorreram nos 14°, 17° e 20° dias após o transplantio, e coleta no 28°. Altura final (A); taxa de crescimento relativo em altura (TCR-h) (B); área foliar total (AFT) (C); área foliar específica (AFE) (D). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste Tukey ($P \leq 0,05$).

2° experimento

Em função dos resultados obtidos no experimento descrito acima apresentarem apenas, em sua maioria, tendências sem diferenças estatísticas, decidiu-se pela repetição desse experimento e também pelo uso de maiores concentrações de selenato. De modo similar, tendências de maiores incremento nos parâmetros biométricos referentes à massa seca foram também obtidas em plantas cultivadas com 25 μM de selenato de

sódio. Assim, a massa seca das folhas (Figura 4A) foi maior para estas plantas do que para as que foram tratadas com 10 e 250 μM de selenato. O mesmo padrão foi observado para massa seca total (Figura 4B) e massa seca do caule (Figura 4C).

Não foram verificadas diferenças para a razão entre biomassa de raiz e parte aérea (R/PA) (Figura 4D). O mesmo ocorreu para a alocação de biomassa na raiz (Figura 4F). Já a alocação de biomassa no caule foi maior em plantas cultivadas na ausência de *Se* e com 75 e 250 μM , do que naquelas cultivadas com 50 μM , as quais apresentaram mais biomassa alocada nas folhas do que as plantas controle e as suplementadas com 5 μM de selenato (Figura 4F).

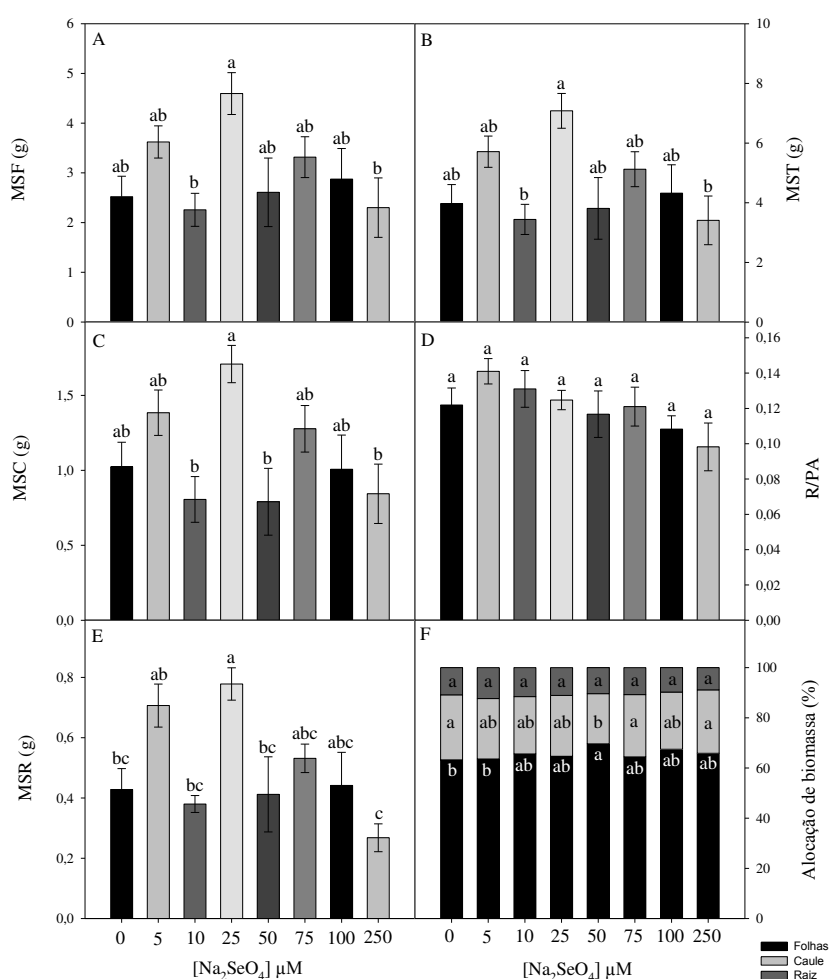


Figura 4. Variação dos parâmetros biométricos referentes à massa seca em resposta ao tratamento com diferentes concentrações de selenato de sódio em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv. Santa Clara) com 21 dias. Aplicações de Na_2SeO_4 ocorreram nos 7°, 10° e 13° dias após o transplântio, e as coletas no 21°. Massa seca das folhas (MSF) (A); massa seca total (MST) (B); massa seca do caule (MSC) (C); Razão entre raiz e parte aérea (R/PA) (D); massa seca da raiz (MSR) (E); alocação de biomassa (F). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste Tukey ($P \leq 0,05$)

Embora a altura final tenha sido maior em plantas cultivadas com 25 μM quando comparadas àquelas com 50 μM , não foram observadas diferenças para a TCR-h (Figuras 5A e 5B). A área foliar total em plantas cultivadas com 25 μM foi maior que a observada em plantas cultivadas com 10, 50 e 250 μM (Figura 5C). De modo diferente ao observado no primeiro experimento (Figura 3D), a AFE foi maior em plantas controle (0 μM) que nas cultivadas com 100 μM (Figura 5D).

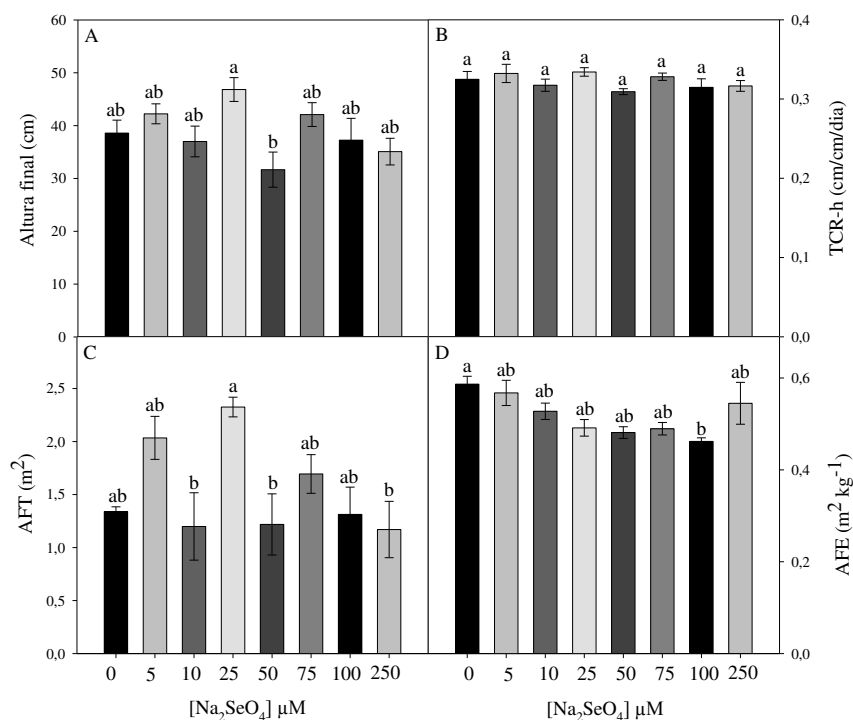


Figura 5. Variação nos parâmetros biométricos referentes à altura e área foliar em resposta ao tratamento com diferentes concentrações de selenato de sódio em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv. Santa Clara) com 21 dias. Aplicações de Na₂SeO₄ ocorreram nos 7°, 10° e 13° dias após o transplantio, e a coleta no 21°. Altura final (A); taxa de crescimento relativo em altura (TCR-h) (B); área foliar total (AFT) (C); área foliar específica (AFE) (D). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste Tukey ($P \leq 0,05$).

A análise de crescimento é um conjunto de métodos que possibilitam a descrição das condições morfofisiológicas da planta em diferentes intervalos de tempo, entre duas amostragens sucessivas, permitindo o acompanhamento da dinâmica da produção fotossintética através da avaliação do acúmulo de massa seca (Barbero *et al.*, 2014). Assim, tomados em conjunto, os dados dos experimentos 1 e 2 revelam, de modo consistente embora nem sempre estatisticamente significativo, tendência a maiores

crescimentos em altura e incremento da massa seca nas plantas cultivadas com 25 μM de selenato. Apesar de plantas cultivadas com 100 μM apresentarem uma tendência a menor crescimento e incremento de biomassa (primeiro experimento- Figura 2), as plantas cultivadas com 250 μM (segundo experimento- Figuras 1, 4 e 5), apresentaram diferenças mais expressivas ao serem comparadas àquelas cultivadas com 25 μM , concentração essa que parece estimular mais o crescimento das plantas nas condições aqui utilizadas.

De posse dos resultados descritos acima, as dosagens de 25 e 250 μM de selenato de sódio foram selecionadas para realização do *priming* em sementes, a fim de se investigar as alterações causadas pelo *Se* em plantas cujas sementes foram previamente tratadas.

3.3 Avaliação fenotípica de plantas submetidas a diferentes concentrações de Na_2SeO_4 via *priming* de sementes

Assim como nos experimentos descritos acima, verificou-se uma tendência de maior comprimento da parte aérea ao final de 21 dias de cultivo para as plantas cujas sementes foram imersas em solução com 25 μM de Na_2SeO_4 (Figura 8A). Esse comportamento foi notado tanto em relação às plantas que não passaram pelo *priming* (sem *priming*), quanto em relação às plantas cujas sementes foram imersas em água destilada e na maior concentração de selenato (250 μM). É importante mencionar também que diferenças aparentes na coloração e na morfologia foliar bem como sintomas de toxicidade do *Se*, como clorose (Hartikainen *et al.*, 2000), necrose, murchamento das folhas e morte prematura (Lehotai e Lyubenova, 2016) não foram observadas (Figura 6).

3.4 Plantas submetidas a diferentes concentrações de Na_2SeO_4 via *priming* de sementes tem crescimento alterado

Tendência geral de incrementos nos parâmetros biométricos relacionados à massa seca foi observada em plantas que passaram pelo *priming* com 25 μM de selenato de sódio. Cumpre ressaltar que, em relação às plantas controle, o incremento das plantas submetidas 25 μM de selenato via *priming* não foi significativo. Entretanto em relação ao *priming* com água destilada e ao *priming* com 250 μM de selenato de sódio, incremento observado em resposta ao *priming* com 25 μM para massa seca das folhas (Figura 7A), massa seca total (Figura 7 B), massa seca do caule (Figura 7C) foram

significativos. De maneira interessante, plantas cujas sementes foram submersas em água destilada apresentaram uma diminuição na massa seca da raiz (Figura 7E) em relação àquelas que não passaram por *priming* ou com *priming* usando 25 μM de selenato. Tanto a razão entre a raiz e parte aérea (Figura 7D) quanto à alocação de biomassa (Figura 7F) em folhas, caule e raiz não foram afetadas pelos tratamentos ora realizados.



Figura 6. Imagem representativa do experimento em que se utilizou o *priming* como forma de aplicação do Se. Planta sem *priming* (A) planta submetida ao *priming* com água destilada (B), planta submetida ao *priming* com 25 μM de selenato de sódio (C) e planta submetida ao *priming* com 250 μM de selenato de sódio (D). Fotos foram obtidas aos 21 dias após o transplântio. Traço em branco representa a escala (17 cm).

A altura final (Figura 8A) e taxa de crescimento relativo em altura (TCR- h) (Figura 8B) foram bastantes similares nos diferentes tratamentos. Verificou-se aumento na área foliar total (Figura 8C) para as plantas com *priming* de 25 μM em comparação ao *priming* com água e com 250 μM ; porém, a área foliar específica (Figura 8D) manteve-se inalterada entre os tratamentos. O diâmetro do caule (Figura 8E) foi maior em plantas cujas sementes foram tratadas com 25 μM de selenato em comparação ao *priming* sem selênio. O número de folhas (Figura 8F) também se mostrou superior nesse tratamento (*priming* com 25 μM) em relação ao *priming* com água destilada e ao com 250 μM de selenato.

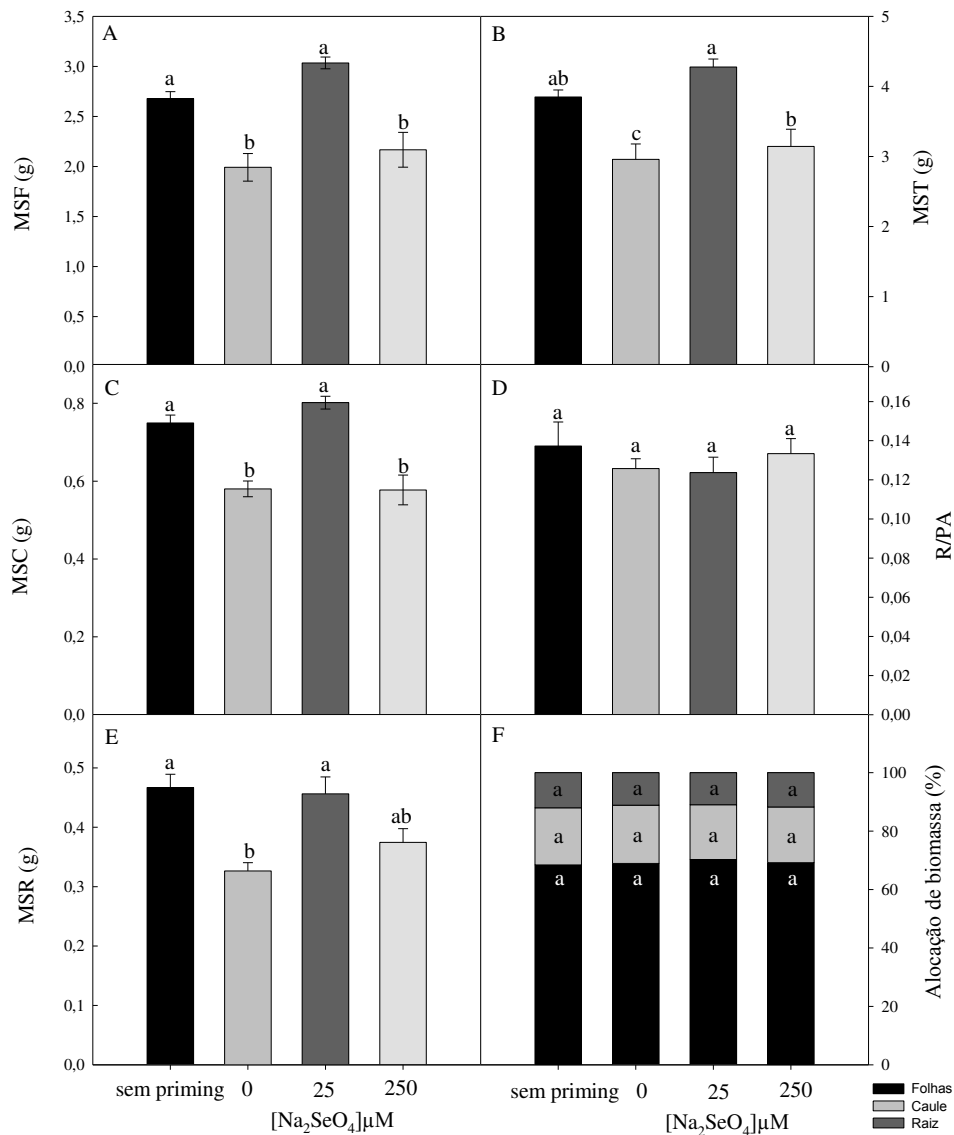


Figura 7. Variação dos parâmetros biométricos referentes à massa seca em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv. Santa Clara) submetidas ao *priming* em sementes com diferentes concentrações de selenato de sódio, água destilada e plantas sem *priming*. Massa seca das folhas (MSF) (A); massa seca total (MST) (B); massa seca do caule (MSC) (C); Razão entre raiz e parte aérea (R/PA) (D); massa seca da raiz (MSR) (E); alocação de biomassa (F). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste Tukey ($P \leq 0,05$).

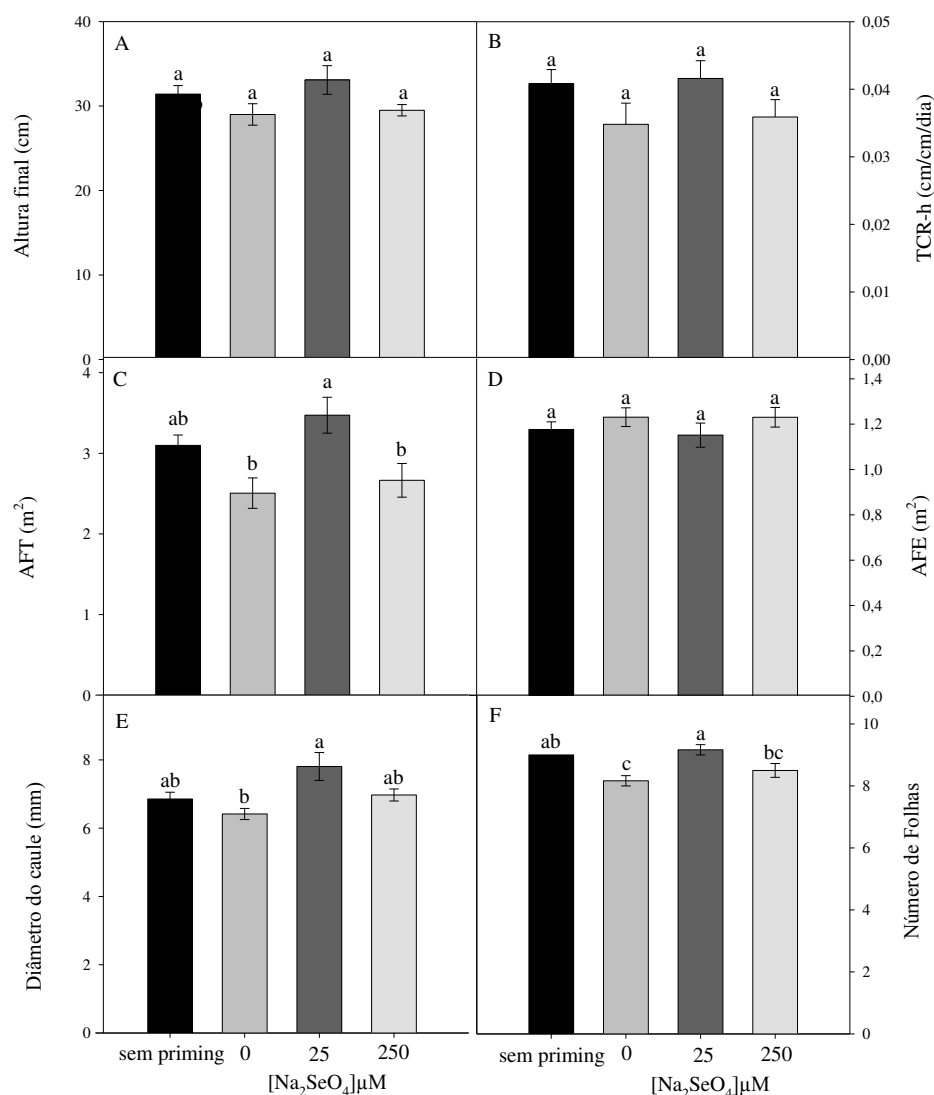


Figura 8. Variação nos parâmetros biométricos referentes à altura, área foliar, diâmetro do caule e número de folhas em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L cv. Santa Clara) submetidas ao *priming* de sementes com diferentes concentrações de selenato de sódio, água destilada e plantas sem *priming*. Altura final (A); taxa de crescimento relativo em altura (TCR-h) (B); área foliar total (AFT) (C); área foliar específica (D); diâmetro do caule (E); número de folhas (F). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste Tukey ($P \leq 0,05$).

3.5 O Selênio não altera os parâmetros de fluorescência e fotossíntese de plantas submetidas a diferentes concentrações de Na_2SeO_4 via *priming* de sementes

A eficiência fotoquímica máxima do FSII (F_v/F_m) (Figura 9A) permaneceu praticamente inalterada entre os diferentes tratamentos. Não se observaram também

diferenças para os demais parâmetros associados à fluorescência da clorofila *a* (Figura 9) como rendimento quântico efetivo do transporte de elétrons no FSII (F_v'/F_m'), coeficiente de extinção fotoquímica (qL), coeficiente de extinção não-fotoquímica (NPQ) e taxa de transporte de elétrons (ETR).

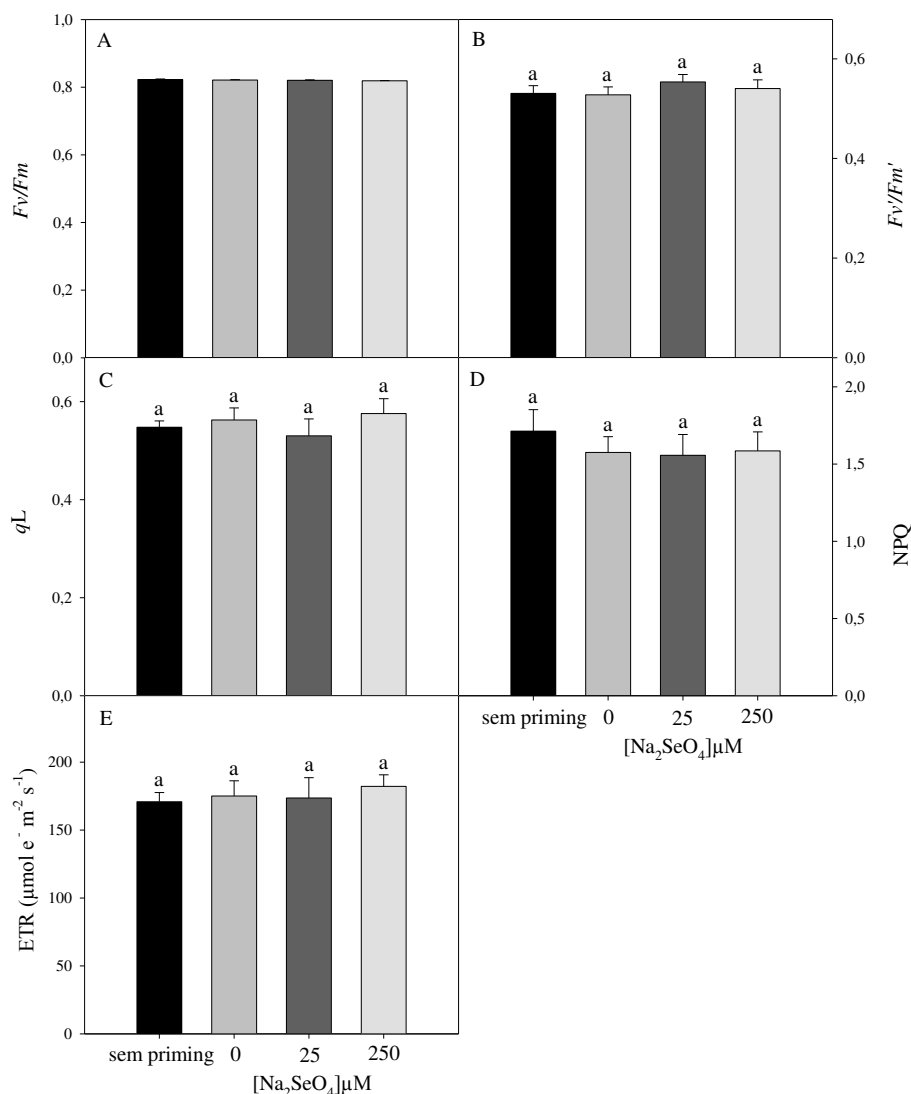


Figura 9. Variação nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv. Santa Clara) submetidas ao *priming* de sementes com diferentes concentrações de selenato de sódio, água destilada e plantas sem *priming*. Eficiência fotoquímica máxima do FSII (F_v/F_m) (A); rendimento quântico efetivo do transporte de elétrons no FSII (F_v'/F_m') (B); coeficiente de extinção fotoquímica (qL) (C); coeficiente de extinção não-fotoquímica (NPQ) (D) e; taxa de transporte de elétrons (ETR) (E). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste Tukey ($P \leq 0,05$).

De modo semelhante ao observado para os parâmetros da fluorescência da clorofila *a*, não foram observadas alterações para os parâmetros de trocas gasosas. Assim, tanto a fotossíntese líquida (*A*) quanto a condutância estomática (g_s), a taxa de transpiração (*E*), a razão entre a concentração interna de CO₂ e a externa (C_i/C_a), a taxa de respiração no escuro (R_d) e a eficiência intrínseca do uso da água (EUAi) não foram afetadas pelos diferentes tratamentos aqui impostos.

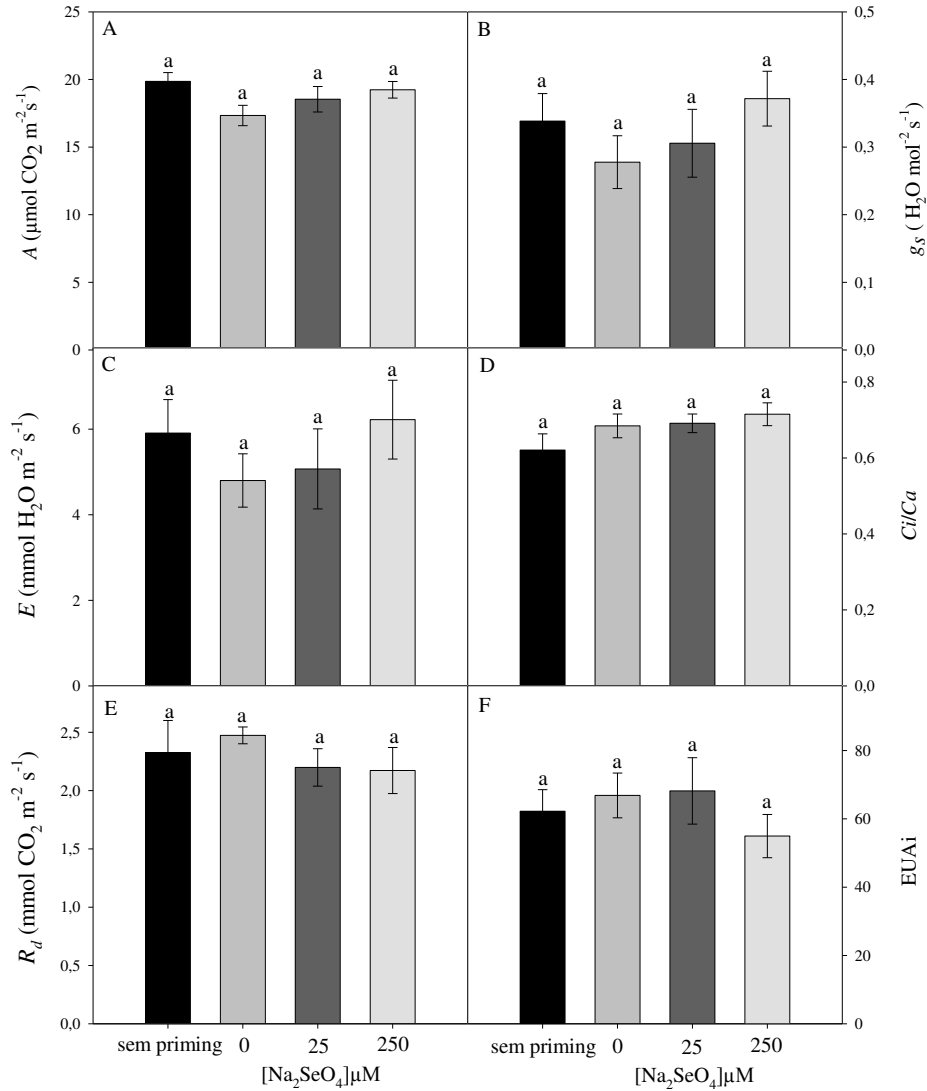


Figura 10. Variação nos parâmetros de trocas gasosas em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv. Santa Clara) submetidas ao *priming* de sementes com diferentes concentrações de selenato de sódio, água destilada e plantas sem *priming*. Fotossíntese líquida (*A*) (A); Condutância estomática (g_s) (B); Taxa de transpiração (*E*) (C); razão entre CO₂ interno e externo (C_i/C_a) (D); Taxa de respiração no escuro (R_d) (E) e; Eficiência intrínseca do uso da água (EUAi) (F). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste Tukey ($P \leq 0,05$).

3.6 Efeitos do Selênio no metabolismo do Carbono e do Nitrogênio

Para verificar a influência do *Se* no metabolismo do N, foram quantificados os teores de clorofila *a* e *b* (Figura 11), aminoácidos e proteínas (Figura 12). Não foram observadas diferenças nos teores de clorofila *a* (Figura 11 A), clorofila total (Figura 11 C) e na razão entre clorofilas *a* e *b* (Figura 11 D). Os teores de clorofila *b* (Figura 11B) das plantas cujas sementes foram tratadas com 25 μ M de selenato foram maiores que em plantas cujas sementes não foram submetidas ao *priming*.

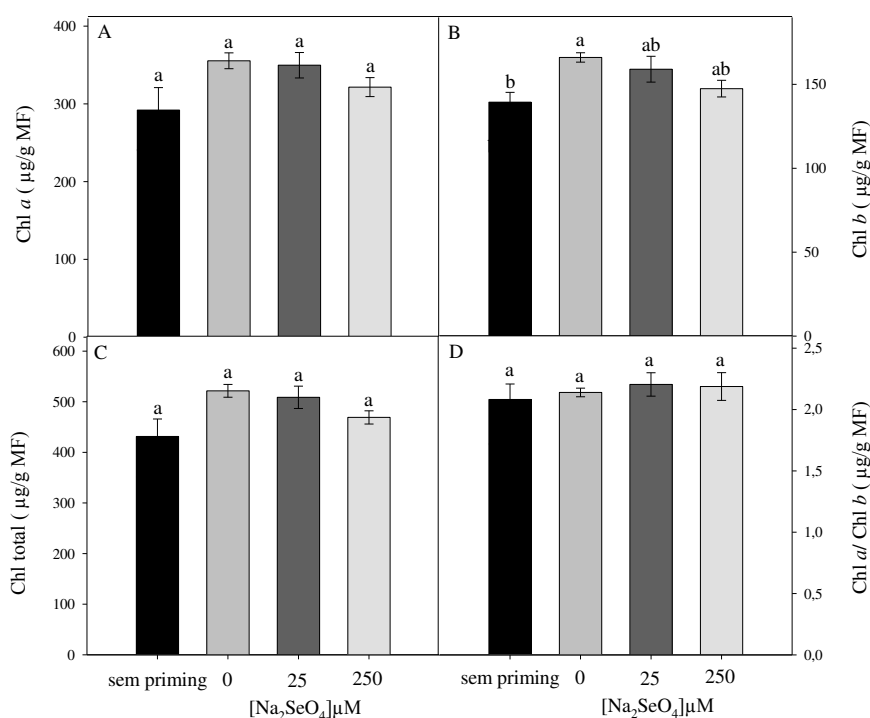


Figura 11. Teores de clorofila em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Santa Clara) submetidas ao *priming* de sementes com diferentes concentrações de selenato de sódio, água destilada e plantas sem *priming*. Clorofila *a* (Chl *a*) (A); clorofila *b* (Chl *b*) (B); Clorofila total (Chl total) (C) e razão entre clorofila *a* e clorofila *b* (Chl *a* / Chl *b*) (D). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Observa-se que as plantas que passaram pelo *priming* com selenato, nas duas concentrações utilizadas (25 e 250 μ M) apresentaram níveis de proteínas inferiores aos observados em plantas que não passaram pelo *priming* (Figura 12 A). Os níveis de aminoácidos totais (Figura 12 B) também foram menores em resposta ao tratamento com *Se*. Assim, tanto plantas submetidas ao *priming* com água destilada quanto aquelas que não passaram pelo tratamento apresentaram maiores níveis de aminoácidos totais em relação às plantas submetidas ao *priming* com selenato.

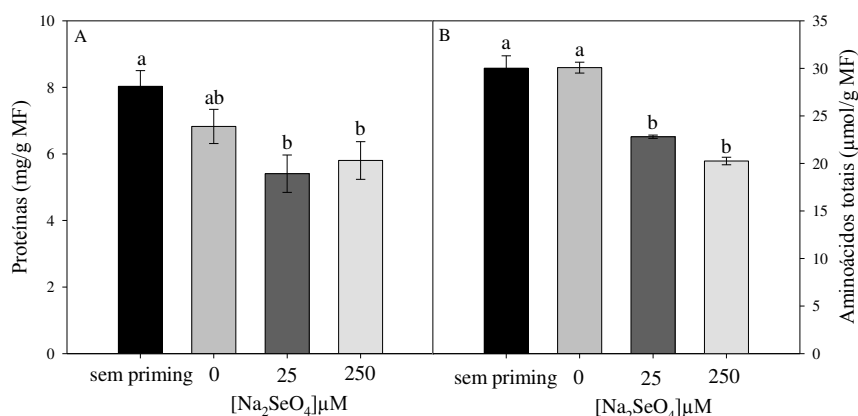


Figura 12. Alteração nos teores de metabólitos envolvidos no metabolismo do nitrogênio em folhas de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv. Santa Clara) submetidas ao *priming* de sementes com diferentes concentrações de selenato de sódio, água destilada e plantas sem *priming*. Proteínas (A); aminoácidos (B). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Analisando-se os metabólitos envolvidos no metabolismo do carbono, observa-se que os níveis de glicose foram inferiores em plantas tratadas com 25 μM de selenato em comparação ao *priming* com água destilada (Figura 13 A). Por outro lado, os conteúdos de frutose (Figura 13 B), sacarose (Figura 13 C) e amido (Figura 13D) não apresentaram diferenças entre os tratamentos. Em adição os teores de malato não variaram entre os tratamentos (Figura 13 E). Adicionalmente, as plantas submetidas ao *priming* com 250 μM de selenato apresentaram maiores teores de fumarato que as plantas submetidas ao *priming* de água e as plantas sem *priming* (Figura 13F).

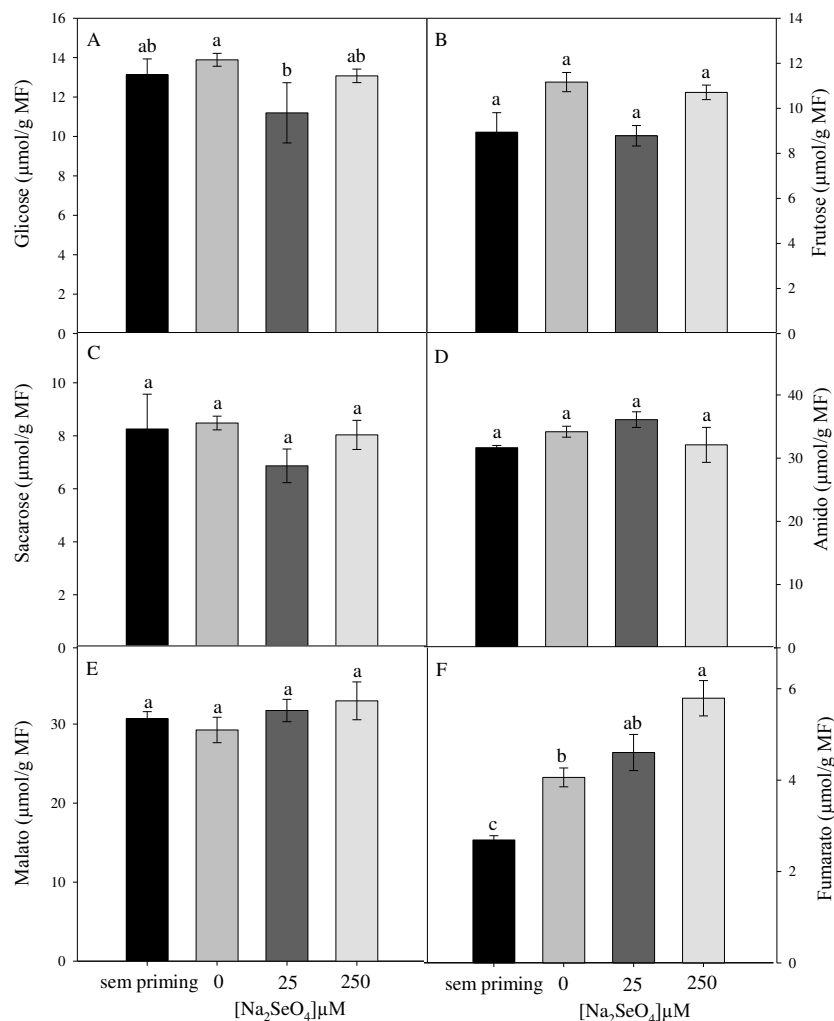


Figura 13. Alteração nos teores de metabólitos envolvidos no metabolismo do carbono em folhas de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv. Santa Clara) submetidas ao *priming* de sementes com diferentes concentrações de selenato de sódio, água destilada e plantas sem *priming*. Glucose (A); frutose (B); sacarose (C); amido (D); malato (E); fumarato. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste Tukey ($P \leq 0,05$).

4. DISCUSSÃO

Os efeitos do *Se* no crescimento vegetal são amplamente reconhecidos. Ademais, os resultados aqui obtidos corroboram com a premissa que esses efeitos são dose-dependentes (Hartikainen *et al.*, 2000). Nesse contexto, observou-se uma clara tendência de ganhos no crescimento para plantas submetidas a reduzidas concentrações de 25 μ M de selenato ao passo que um comportamento antagônico foi notado em

plantas cultivadas em altas concentrações de 250 μ M de selenato. Cabe mencionar que o padrão aqui observado não parece estar relacionado diretamente nem à forma de aplicação nem à idade da planta, uma vez que tanto via *priming* em sementes (Figura 6) como via soluções aplicadas diretamente ao solo em plantas com diferentes idades resultados similares foram obtidos aqui.

As alterações no crescimento em decorrência de *Se* parecem ser mediadas por alterações fotossintéticas e consequentemente em mudanças na síntese das trioses fostatadas (Djanaguiraman *et al.*, 2010). Nesse contexto, a manutenção em parâmetros de trocas gasosas e de fluorescência da clorofila *a* observada neste trabalho demonstram que o processo fotossintético, incluindo a captação de carbono e reações fotoquímicas, não são alteradas em tomateiro quando em presença de *Se*. Entretanto, em função das pequenas alterações observadas em compostos associados ao metabolismo do carbono (Figura 13), é plausível sugerir que tanto a assimilação quanto o metabolismo do carbono são possivelmente ajustados em presença de *Se*. Registre-se também que uma modulação metabólica, específica para a presença de *Se*, envolvendo não somente a aquisição e o acúmulo de carbono, mas também a forma como esse carbono é utilizado pela planta, foi recentemente demonstrada em *A. thaliana* (Ribeiro *et al.*, 2016). Ademais, estudos envolvendo modelos metabólicos sugerem que em plantas a organização do metabolismo, em particular do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, é altamente dependente das exigências metabólicas e fisiológicas da célula (Sweetlove *et al.*, 2010). De forma interessante, essa modulação metabólica também pode ser observada, ao menos parcialmente, no presente estudo. Assim, plantas tratadas com *Se*, via *priming*, apresentaram maiores conteúdos de fumarato (Figura 13F) sem, no entanto, alterar os níveis de malato (Figura 13E), sugerindo um comportamento não-cíclico do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, com a interrupção no fluxo da conversão de fumarato a oxaloacetato (Sweetlove *et al.*, 2010). Embora as evidências aqui apresentadas sejam apenas circunstanciais e, portanto, em clara necessidade de estudos futuros e complementares, os ajustes metabólicos aqui observados são similares aos observados em condições de estresses vários (Singh *et al.*, 2009; Lemire *et al.*, 2010). Como mencionado acima, as alterações no crescimento parecem ter ocorrido sem danos bioquímicos ou mesmo fotoquímicos à fotossíntese (Figuras 9, 10 e 11). Com efeito, o malato, um intermediário entre a conversão do fumarato a oxaloacetato, não teve seu conteúdo alterado, o que sugere que, possivelmente, o fumarato atue como fonte alternativa de carbono para o crescimento, particularmente para as plantas tratadas com

25 μ M de selenato de sódio. O uso de fumarato como fonte de carbono, sustentando o crescimento tem sido relatado para diversas espécies (revisado em Araújo *et al.*, 2012). Foi demonstrado, por exemplo, que espécies de crescimento rápido apresentaram, em relação a espécies de crescimento lento, maiores conteúdos de ácidos orgânicos e menores teores de açúcares solúveis (Poorter *et al.*, 1992). Ao se fazer uma associação entre a tendência a menores níveis de glicose e ao acúmulo de fumarato (Figuras 13A - F), aqui encontrada nas plantas tratadas com baixas concentrações de *Se* (25 μ M), é possível inferir que o acúmulo de fumarato seja uma das maneiras utilizada por plantas de tomate para se ajustarem à presença de *Se* sem prejuízos ao crescimento. Coletivamente, isso garantiria, ao menos parcialmente, manutenção das taxas fotossintéticas, como aqui observado (Figura 10A)

Os efeitos causados pelo estresse oxidativo na respiração vegetal são conflitantes e dependentes da severidade do mesmo (Dimkovikj e Hoewyk, 2014). Sendo o *Se* considerado um pró oxidante em altas concentrações (Hartikainen *et al.*, 2001), plantas tratadas com altas dosagens de selenato (250 μ M), ao apresentarem aumento nos níveis de fumarato e concomitante redução do crescimento, revalidam o reajuste no fluxo metabólico envolvendo a conversão de fumarato a oxaloacetato que, neste caso, seria necessária para tolerância ao estresse decorrente da suplementação em altas dosagens de *Se* em tomate. Outros estudos relatam a atuação do fumarato como fonte alternativa de carbono similar ao amido (Tschoep *et al.*, 2009; Pracharoenwattana *et al.*, 2010; Xue *et al.*, 2010) e também no combate a espécies reativas de oxigênio em *Pseudomonas fluorescens* (Thomas *et al.*, 2016). Em adição, fumarato tem sido associado à assimilação de *Se* em bactérias (Li *et al.*, 2014), demonstrando um papel versátil desse ácido orgânico em condições e organismos diversos, bem como uma estreita relação com o metabolismo do *Se*.

Verificou-se que o *Se* promove melhorias na assimilação do nitrogênio em cevada (Aslam *et al.*, 1990). A assimilação de nitrogênio é muitas vezes associada à AFE, consideradas assim grandezas diretamente proporcionais (Poorter, 1998); porém, não foram observadas notáveis alterações em relação à área foliar para plantas tratadas com *priming* de *Se* (Figuras 8C,D). Por outro lado, observou-se uma nítida diminuição nos conteúdos de aminoácidos e proteínas nas plantas em presença de *Se* (Figuras 12, BB). Em conjunto, esses resultados indicam que aminoácidos e proteínas possam ter sido degradados em precursores de glicose, como por exemplo o próprio fumarato, possibilitando, assim, o crescimento de plantas tratadas com baixas concentrações e a

tolerância das mesmas às altas concentrações de *Se*. Por outro lado, o *Se* pode ser tóxico ao metabolismo celular, pois dada a sua similaridade química com o enxofre (S), pode substituir, indiscriminadamente, o S em proteínas sulfuradas (Stadtman, 1996 ; Eustice *et al.*, 1981; Brown, 1982), convertendo, por exemplo, cisteína a selenocisteína. Nesse contexto, é então possível associar a tolerância ao *Se* à redução máxima do processo de conversão de cisteína a selenocisteína (Dimkovikj *et al.*, 2015). Saliente-se também que as proteínas que tem sua estrutura danificada pela incorporação de selenoaminoácidos são degradadas pela via ubiquitina-proteassoma (Dimkovikj e Hoewyk, 2014; Dimkovikj *et al.*, 2015). Considerando, pois, os resultados aqui obtidos, é possível que, em presença de *Se*, aumentos no processo de ubiquitinação possam explicar, ao menos parcialmente, a diminuição dos conteúdos de proteína. Entretanto, mais estudos se fazem necessários para determinar o destino metabólico das proteínas sintetizadas em plantas de tomate em presença de *Se*.

De forma oposta aos resultados aqui encontrados, o tratamento com altas concentrações de *Se* não alterou o conteúdo de aminoácidos e proteínas em *A. thaliana* (Ribeiro *et al.*, 2016). Não obstante, menor crescimento em presença de *Se* em *Arabidopsis* foi associado a mudanças no metabolismo de amido. Assim, foi observado que quando essas plantas são tratadas com *Se* níveis consideráveis de amido ao final da noite são observados, indicando que o tratamento com *Se* afetou grandemente a degradação do amido comprometendo, assim, o crescimento em *A. thaliana* (Ribeiro *et al.*, 2016). Os resultados aqui obtidos indicam que o conteúdo de amido, mensurado unicamente ao meio dia, não foi alterado em plantas de tomate suplementadas com *Se*. Todavia, estudos mais detalhados acerca do metabolismo são necessários para então verificar se a influência do *Se* na síntese e degradação de amido em plantas de tomate é distinta daquela observada em *A. thaliana*.

Os resultados aqui obtidos estão de acordo com diversos estudos prévios que sugerem uma singular reorganização metabólica em plantas tratadas com *Se*. Cabe mencionar que essa reorganização parece depender das concentrações de *Se* utilizadas, da forma química em que o *Se* é aplicado (selenato ou selenito) bem como da forma de aplicação (Ribeiro *et al.*, 2016; Dimkovikj e Hoewyk, 2014). A ausência de grandes alterações no crescimento, incremento de biomassa e demais parâmetros aqui analisados pode estar relacionada, ao menos em partes, ao período em que foram feitas as medições e coleta de material vegetal. Nesse contexto, plântulas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) tratadas com *Se* apresentaram diminuições significativas no

crescimento (Çolak, 2014). Tomados em conjunto, esses resultados indicam que estudos mais detalhados, com acompanhamento periódico dos parâmetros de crescimento, parâmetros fotossintéticos e bioquímicos em associação a estudos que possibilitem entender o processo de síntese, acúmulo e degradação de amido, são ainda claramente necessários para se elucidar como a regulação do crescimento e a modulação metabólica ocorre em resposta a presença de *Se* em plantas.

5. CONCLUSÃO

A presença de *Se* culminou com uma tendência a maiores crescimento e ganho em biomassa em plantas submetidas a baixas concentrações (25 μ M) ao passo que efeito contrário é observado em plantas submetidas a concentrações elevadas (250 μ M). Tais alterações não estão associadas a alterações em parâmetros relacionados à fotossíntese nem à fluorescência da clorofila *a*. No entanto, alterações no crescimento em resposta a *Se* parecem ocorrer às expensas de um reajuste metabólico, como aqui demonstrado, por aumentos significativos no conteúdo de fumarato acoplados à diminuição dos níveis de proteína e aminoácidos em plantas cultivadas com 25 μ M de selenato. Embora evidências circunstanciais e limitadas em função das análises metabólicas aqui apresentadas foram obtidas no presente trabalho, quando consideradas concomitantemente com outros trabalhos relatados na literatura, faz-se evidente que mais estudos relacionados ao fluxo metabólico de aminoácidos e de proteínas sintetizadas em presença de *Se* são ainda necessários. Assim, os baixos níveis de proteínas aqui relatados podem estar associados não somente a um reajuste metabólico, mas também à degradação específica de selenoproteínas via ubiquitinação. Adicionalmente, tendo em mente que a despeito das alterações no crescimento aqui observadas, o acúmulo de amido, mensurado exclusivamente ao meio dia, não foi afetado em presença de *Se*. Uma pormenorizada investigação envolvendo o metabolismo primário em geral e, em particular, do amido irá, possivelmente, se traduzir em um melhor entendimento acerca da captação e assimilação do carbono em plantas de tomate tratadas com *Se*. Em conjunto, as informações aqui obtidas podem auxiliar na compreensão dos mecanismos fisiológicos e metabólicos associados ao *Se* em plantas de tomate, com possíveis implicações para fitorremediação e biofortificação, em resposta ao *Se*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad R, Waraich EA, Nawaz F, Ashraf MY, Khalid M** (2015) Selenium (Se) improves drought tolerance in crop plants– a myth or fact ?. *Journal of the science of food and agriculture*, **96**: 372-380
- Araújo W L, Tohge T, Osorio S, Lohse M, Balbo I, Krahner I, Fernie, A. R.** (2012). Antisense inhibition of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex in tomato demonstrates its importance for plant respiration and during leaf senescence and fruit maturation. *The Plant Cell* **24**: 2328-2351
- Aslam M, Harbit K B, Huffaker RC** (1990). Comparative effects of selenite and selenate on nitrate assimilation in barley seedlings. *Plant, cell & environment*, **13**: 773-782
- Barbero LM, Prado TF, Basso KC, Lima LA, Motta KM, Krüger BC, da Silva GAS** (2014). Análise de crescimento em plantas forrageiras aplicada ao manejo de pastagens. *Notícias VeterináriaS*, **19**: 1-8
- Barillas JRV, Quinn CF, Pilon-Smits E A.. H** (2011) Selenium accumulation in plants— phytotechnological applications and ecological implications. *Internacional Journal of Phytoremediation* **13**: 166–178
- Brown TA, Shrift, A.** (1982). Selenium: toxicity and tolerance in higher plants. *Biological Reviews*, **57**: 59-84
- Çolak G, Baykul CG, Catak E, Caner N,** (2014). The effects of selenium on *Lycopersicon esculentum* Mill. seedlings. *Pakistan Journal of Botany* , **46**: 911-920
- DaMatta FM, Rena AB** (2002) Ecofisiologia de cafezais sombreados e a pleno sol. In L Zambolim, ed, *O Estado da Arte de Tecnologias na Produção de Café*, UFV, Viçosa, pp. 93-135
- Dimkovikj A, Fisher B, Hutchison K, Hoewyk D Van** (2015) Stuck between a ROS and a hard place : Analysis of the ubiquitin proteasome pathway in selenocysteine treated *Brassica napus* reveals different toxicities during selenium assimilation. *Journal of Plant Physiology* **181**: 50–54
- Dimkovikj A, Hoewyk D Van** (2014) Selenite activates the alternative oxidase pathway and alters primary metabolism in *Brassica napus* roots : evidence of a mitochondrial stress response. *BMC Plant Biology*, **14**: 1–15
- Diwadkar-Navsariwala V, Prins GS, Swanson SM, Birch L a, Ray VH, Hedayat S, Lantvit DL, Diamond AM** (2006) Selenoprotein deficiency accelerates prostate

carcinogenesis in a transgenic model. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA **103**: 8179–8184

- Djanaguiraman M, Devi DD, Shanker AK, Sheeba JA, Bangarusamy U** (2004) Impact of selenium spray on monocarpic senescence of soybean (*Glycine max* L .) Food and Agriculture Organization of the United Nations. **2**: 44–47
- Djanaguiraman M, Prasad PVV, Seppanen M** (2010) Selenium protects sorghum leaves from oxidative damage under high temperature stress by enhancing antioxidant defense system. Plant Physiology Biochemistry **48**: 999–1007
- El Mehdawi AF, Pilon-Smits EAH.** (2012). Ecological aspects of plant selenium hyperaccumulation. Plant Biology, **14**: 1-10
- Eustice DC, Kull FJ, Shrift A.** (1981). Selenium toxicity: aminoacylation and peptide bond formation with selenomethionine. Plant Physiology, **67**: 1054-1058
- Fairweather-Tait SJ, Bao Y, Broadley MR, Collings R, Ford D, Hesketh,JE, Hurst R.** (2011). Selenium in human health and disease. Antioxidants & redox signaling, **14**: 1337-1383
- 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**: 250-263
- Filek M, Keskinen R, Hartikainen H, Szarejko I, Janiak A, Miszalski Z, Golda A** (2008). The protective role of selenium in rape seedlings subjected to cadmium stress. Journal of Plant Physiology, **165**: 833-844
- Flohe L, Günzler W a, Schock HH** (1973) Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. FEBS Lett 32: 132–134
- Fu LH, Wang XF, Eyal Y, She YM, Donald LJ, Standing KG, Ben-Hayyim, G.** (2002). A selenoprotein in the plant kingdom mass spectrometry confirms that an opal codon (UGA) encodes selenocysteine in Chlamydomonas reinhardtii glutathione peroxidase. Journal of Biological Chemistry, **277**: 25983-25991
- Ghoraba WF, Mohsen AA** (2015). Role of Selenium on *Vicia faba* Seedlings Subjected to Mercury and Cadmium Stress. Integrated Journal of British, **2**:16-44
- Ghosh P, Roy SS, Chakraborty P, Ghosh S, Bhattacharya S** (2013) Effects of organoselenium compound 2-(5-selenocyanatopentyl)- benzo[de]isoquinoline 1,3-dione on cisplatin induced nephrotoxicity and genotoxicity: An investigation of the influence

of the compound on oxidative stress and antioxidant enzyme system. *BioMetals* **26**: 61–73

- Gibon Y, Blaesing OE, Hannemann J, Carillo P, Ho M, Palacios N, Cross J, Selbig J, Stitt M** (2004) A Robot-Based Platform to Measure Multiple Enzyme Activities in Arabidopsis Using a Set of Cycling Assays: Comparison of Changes of Enzyme Activities and Transcript Levels during Diurnal Cycles and in Prolonged Darkness. *The Plant Cell* **16**: 3304–3325
- Govasmark E, Salbu B** (2011) Translocation and re-translocation of selenium taken up from nutrient solution during vegetative growth in spring wheat. *Journal of Science Food and Agriculture* **91**: 1367–1372
- Hamilton SJ** (2004) Review of selenium toxicity in the aquatic food chain. *Science Total and Environmental* **326**: 1–31
- Hansen D, Duda PJ, Zayed A, Terry N.** (1998). Selenium removal by constructed wetlands: role of biological volatilization. *Environmental Science & Technology*, **32**: 591-597
- Hanson B, Garifullina GF, Lindblom SD, Wangeline A, Ackley A, Norton AP, Lawrence CB, Pilon-smits EAH** (2003) Selenium accumulation protects *Brassica juncea* from invertebrate herbivory and fungal infection. *New Phytologist* **159**: 461-469
- Hartikainen H, Pietola L, Simojoki A** (2001) Quantification of fine root responses to selenium toxicity. *Agric Food Sci Finl* **10**: 53–58
- Hartikainen H, Xue T, Piironen V** (2000). Selenium as an anti-oxidant and pro-oxidant in ryegrass. *Plant and Soil*, **225**:193-200.
- Hasanuzzaman M, Fujita M** (2011) Selenium pretreatment upregulates the antioxidant defense and methylglyoxal detoxification system and confers enhanced tolerance to drought stress in rapeseed seedlings. *Biological trace element research* **143**: 1758–1776
- Hawrylak-nowak B, Matraszek R** (2010) Selenium Modifies the Effect of Short-Term Chilling Stress on Cucumber Plants. *Biological trace element research* **138**: 307–315
- Khaliq A, Aslam F, Matloob A, Hussain S, Geng M, Wahid A, Rehman H** (2015). Seed priming with selenium: consequences for emergence, seedling growth, and biochemical attributes of rice. *Biological trace element research*, **166**: 236-244.
- Lehotai N, Lyubenova L** (2016) Nitro-oxidative stress contributes to selenite toxicity in pea (*Pisum sativum* L). *Plant and Soil*, **400**:107–122
- Lemire J, Mailloux R, Auger C, Whalen D, Appanna VD** (2010) Minireview *Pseudomonas fluorescens* orchestrates a fine metabolic-balancing act to counter aluminium toxicity. *Environmental Microbiology* **12**: 1384–1390

- Li D, Cheng Y, Wu C, Li W, Li N, Yang Z** (2014) Selenite reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 is mediated by fumarate reductase in periplasm. Scientific reports, **4**:1–7.
- Lin ZQ, Terry N** (2003) Selenium removal by constructed wetlands: Quantitative importance of biological volatilization in the treatment of selenium-laden agricultural drainage water. Environmental Science of Technology **37**: 606–615
- Lobanov A V, Fomenko DE, Zhang Y, Sengupta A, Hatfield DL, Gladyshev VN** (2007) Evolutionary dynamics of eukaryotic selenoproteomes: large selenoproteomes may associate with aquatic life and small with terrestrial life. Genome biology **8**
- Mehdi Y, Hornick J, Istasse L, Dufrasne I** (2013) Selenium in the Environment, Metabolism and Involvement in Body Functions. Molecules **18**: 3292-3311
- Mielke MS, Hoffmann A, Endres L, Fachinello JC** (1995) Comparison of laboratory and field methods for the estimation of leaf area of wild fruit species. Scientia Agricola **52**: 82-88
- Mora ML, Durán P, Acuña AJ, Cartes P, Demanet R, Gianfreda L** (2015) Improving selenium status in plant nutrition and quality. Journal of Soil Science and Plant Nutrition **15**: 486–503
- Nancy D, Arulselvi PI.** (2014). Effect of Selenium Fortification on Biochemical Activities of Tomato (*Solanum lycopersicum*) Indo American Journal of Pharmaceutical Research ..., **4**:3997-4005
- Nawaz F, Ashraf MY, Ahmad R, Waraich EA** (2013) Selenium (Se) seed priming induced growth and biochemical changes in wheat under water deficit conditions. Biological Trace Element Research **151**: 284–293
- Novoselov S V, Rao M, Onoshko N V, Zhi H, Kryukov G V, Xiang Y, Weeks DP, Hat DL, Gladyshev VN** (2002) Selenoproteins and selenocysteine insertion system in the model plant cell system , *Chlamydomonas reinhardtii*. The Embo Journal **21**: 3681–3693
- Nunes-nesi A, Carrari F, Gibon Y, Sulpice R, Lytovchenko A, Fisahn J, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ, Fernie AR** (2007) Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. The plant Journal **50**:1093–1106
- 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. Journal of Hazardous Materials **287**: 384–391

- Pedrero Z, Madrid Y, Hartikainen H, Cámara C** (2007). Protective effect of selenium in broccoli (*Brassica oleracea*) plants subjected to cadmium exposure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**: 266-271
- Pennanen A, xue T, hartikainen H** (2002) Protective role of selenium in plant subjected to severe UV irradiation stress. *Journal of Applied Botany and Food Quality* **76**: 66–76
- Poorter H, Evans JR.** (1998). Photosynthetic nitrogen-use efficiency of species that differ inherently in specific leaf area. *Oecologia*, **116**: 26-37
- Poorter H, Bergkotte M** (1992) Chemical composition of 24 wild species differing in relative growth rate. *Plant Cell and Environment* **15**: 221–229
- Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE** (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *BBA - Bioenergetics* **975**: 384–394
- Pracharoenwattana I, Zhou W, Keech O, Francisco PB, Udomchalothorn T, Tschoep H, Stitt M, Gibon Y, Smith SM** (2010) Arabidopsis has a cytosolic fumarase required for the massive allocation of photosynthate into fumaric acid and for rapid plant growth on high nitrogen. *The Plant Journal* **62**: 785–795
- Prauchner CA** (ed) (2014) A importância do Selênio para a Agropecuária e Saúde Humana. Editora UFSM, Santa Maria- RS
- Qing X, Zhao X, Hu C, Wang P, Zhang Y** (2015) Ecotoxicology and Environmental Safety Selenium alleviates chromium toxicity by preventing oxidative stress in cabbage (*Brassica campestris L . ssp . Pekinensis*) leaves. *Ecotoxicol Environmental* **114**: 179–189
- Rayman MP** (2008) Food-chain selenium and human health: emphasis on intake *British Journal of Nutrition*. 254–268
- Ribeiro DM, Silva Júnior DD, Cardoso FB, Martins AO. Silva, AW, Nascimento VL, Araújo WL** (2016) Growth inhibition by Selenium is associated with changes in primary metabolism and nutrient levels in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environmental*
- Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG** (1973) Selenium: Biochemical role as a component of Glutathione Peroxidase. *Science* **179**: 588–590
- Seppänen M, Turakainen M, Hartikainen H.** (2003). Selenium effects on oxidative stress in potato. *Plant Science*, **165**:311-319

- Silva, F. D., & Azevedo, C. D.** (2002). Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, **4**: 71-78
- Sors TG, Ellis DR, Salt DE** (2005) Selenium uptake , translocation , assimilation and metabolic fate in plants. *Photosynthesis research*, **86**: 373–389
- Stadtman TC** (1996). Selenocysteine. *Annual review of Biochemistry*, **65**: 83-100.
- Sweetlove LJ, Beard KFM, Nunes-nesi A, Fernie AR, Ratcliffe RG** (2010) Not just a circle : flux modes in the plant TCA cycle. *Trends Plant Science* **15**: 462–470
- Thomas SC, Alhasawi A, Auger C, Omri A, Appanna VD** (2016) The role of formate in combatting oxidative stress. *Antonie Van Leeuwenhoek* **109**: 263–271
- Tschoep H, Gibon Y, Carillo P, Armengaud P, Szecowka M, Nunes-Nesi A, Fernie AR, Koehl K, Stitt M** (2009) Adjustment of growth and central metabolism to a mild but sustained nitrogen-limitation in Arabidopsis. *Plant, Cell and Environment* **32**: 300–318
- Van Huysen T, Abdel-Ghany S, Hale KL, LeDuc D, Terry N, Pilon-Smits EAH** (2003) Overexpression of cystathionine- γ -synthase enhances selenium volatilization in *Brassica juncea*. *Planta* **218**: 71–78
- Watts DL, Ph D** (1817) The Nutritional Relationships of Selenium. *Journal of Orthomolecular Medicine* **9**:111–117
- White PJ** (2015) Selenium accumulation by plants. *Annals of Botany*. pp:1-19
- White PJ, Brown PH** (2010) Plant nutrition for sustainable development and global health. *Annals of Botany* **105**: 1073–1080
- Xue T, Hartikainen H, Piironen V** (2001) Antioxidative and growth-promoting effect of selenium on senescing lettuce. *Plant and Soil*, **237**: 55–61
- Xue X, Li W, Li Z, Xia Y, Ye Q** (2010) Enhanced 1,3-propanediol production by supply of organic acids and repeated fed-batch culture. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology* **37**: 681–687
- Yao X, Chu J, Wang G** (2009) Effects of Selenium on Wheat seedlings under drought stress. *Biological Trace Element Research*, **130**: 283–290
- Yuan L, Yin X, Li M** (2015) Biofortification and phytoremediation of selenium in China. **6**: 1–8
- Zhang Y, Gladyshev VN** (2011). Comparative Genomics of trace element dependence in biology. *Journal of Biological Chemistry*, **286**: 23623-23629.
- Zhu Y, Pilon-smits EAH, Zhao F, Williams PN, Meharg AA** (2009) Selenium in higher plants : understanding mechanisms for biofortification and phytoremediation. *Trends in plant science*, **14**:436-442.

Zhu YL (1999) Cadmium tolerance and accumulation in indian mustard is enhanced by overexpressing Gamma-Glutamylcysteine Synthetase. *Plant Physiol* **121**: 1169–1177

CAPÍTULO II
APLICAÇÃO DE SELÊNIO VIA *PRIMING* EM SEMENTES E SEUS
IMPACTOS NA RESPOSTA AO DÉFICIT HÍDRICO EM TOMATEIRO
(*Solanum lycopersicum* L.)

1. INTRODUÇÃO

Embora aproximadamente 70% da Terra seja constantemente coberta por água (Küppers *et al.*, 2014; Saradadevi *et al.*, 2014), apenas 2,5% dessa água é potável (Gleick e Palaniappan, 2010) e dois terços dessa reduzida quantidade são destinados ao uso na agricultura (Chai *et al.*, 2016). Considerando o estresse multidimensional por seca um dos maiores limitantes à produtividade agrícola (Waraich *et al.*, 2011), através de severos prejuízos ao crescimento e desenvolvimento das plantas (Li *et al.*, 2009), estudos que possibilitem uma maior compreensão dos impactos da limitação hídrica sobre as plantas, em geral, são ainda necessários. Ademais, a identificação dos mecanismos de tolerância envolvidos na resposta à seca, possibilitando a obtenção de materiais promissores aliados ao desenvolvimento de técnicas de cultivo que culminem com a manutenção de produtividades adequadas, mesmo em cenários ambientais desfavoráveis, é amplamente desejada.

Dentre os mais diversos e possíveis recursos atualmente disponíveis para se atenuar os efeitos da limitação hídrica, o *priming* em sementes vem sendo amplamente estudado (Jisha *et al.*, 2013; Nawaz *et al.*, 2013; Paparella *et al.*, 2015; Zheng *et al.*, 2015). Com efeito, essa técnica, baseada na hidratação controlada de sementes é capaz de promover atividades metabólicas antes mesmo da protusão da radícula (Nawaz *et al.*, 2013), vem sendo reconhecida como altamente eficaz no aumento na tolerância face à diversos estresses em plantas (Jisha *et al.*, 2013). Salienta-se aqui que o *priming* pode ser realizado a partir da imersão das sementes em soluções contendo compostos naturais e/ou sintéticos (Jisha *et al.*, 2013). Verifica-se, pois, que plantas submetidas a um tratamento prévio (*priming*) com diferentes compostos químicos, passam por mudanças metabólicas e morfológicas acentuadas que parecem modificar também as suas respostas a condições de estresses abióticos.

Registre-se também que, frente às condições adversas às quais as plantas estão frequentemente submetidas, tem sido relatada uma relação positiva entre o Selênio (*Se*) e a diminuição dos danos ocasionados por estresses abióticos vários, incluindo altas (Djanaguiraman *et al.*, 2010) e baixas temperaturas (Chu *et al.*, 2010), salinidade (Diao *et al.*, 2014; Mozafariyan e Kamelmanesh, 2016), dentre outros. Cumpre ressaltar também que o papel do *Se* no ajuste do *status* hídrico vegetal em condições de deficiência hídrica foi previamente registrado (Kuznetsov *et al.*, 2003; Yao *et al.*, 2009; Hasanuzzaman e Fujita, 2011; Pukacka *et al.*, 2011; Nawaz *et al.*, 2013; Ahmad *et al.*, 2015). Não obstante, os mecanismos fisiológicos específicos por detrás desses efeitos

positivos do *Se* em plantas não são ainda totalmente compreendidos (El-Ramady *et al.*, 2015; Xue *et al.* 2001).

Com efeito, o *priming* em sementes com *Se* tem se apresentado como um mecanismo promissor na atenuação dos efeitos do déficit hídrico (Chen e Sung, 2001; Yeh *et al.*, 2005), bem como na melhora da germinação de sementes e do metabolismo oxidativo (Chen, 2001) e na regulação do crescimento (Germ *et al.*, 2007). As modificações no metabolismo vegetal em decorrência do *Se* parecem estar envolvidas com as alterações promovidas pelo mesmo no metabolismo mitocondrial, como demonstrado recentemente em *A. thaliana* (Ribeiro *et al.*, 2016); entretanto, muitas lacunas a respeito da atuação do *Se* no metabolismo vegetal tanto sob condições ótimas como sob déficit hídrico são ainda recorrentes.

A grande maioria dos trabalhos associando a presença de *Se* e a tolerância a estresses abióticos tem sido em plântulas ou plantas jovens. Com efeito, pouco ou nada parece ter sido ainda explorado acerca dos impactos fisiológicos e metabólicos de níveis distintos de *Se* aplicados via *priming* em sementes de tomate. O presente trabalho buscou, pois, examinar em detalhes as seguintes questões: (i) o *priming* em sementes com *Se* apresenta efeito atenuador do déficit hídrico evidenciado em aspectos biométricos das plantas? (ii) a aplicação do *Se* via *priming* em sementes promove alterações nas trocas gasosas e no metabolismo primário em plantas de tomate submetidas à deficiência hídrica ? e (iii) o *Se* ameniza os efeitos do estresse hídrico ao potencializar mecanismos antioxidativos e, em última instância, favorece as trocas gasosas? Diante do exposto, objetivou-se uma pormenorizada caracterização fisiológica e metabólica de plantas de tomate submetidas ao déficit hídrico buscando uma melhor compreensão da influência do *Se* nessa resposta.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal e condições de cultivo

O *priming* foi realizado mediante a imersão de sementes de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv. Santa Clara) em soluções de selenato de sódio (Na_2SeO_4 , Sigma Aldrich) em duas concentrações previamente estabelecidas (25 μM e 250 μM). Além dessas dosagens (25 e 250 μM de selenato de sódio) sementes foram também imersas em água destilada, para que os efeitos observados pudessem ser atribuídos ao *Se* e não somente ao condicionamento fisiológico *per se*. Adicionalmente, plantas cujas sementes não passaram pelo condicionamento via *priming* foram também avaliadas, com o intuito

de se apresentarem como as respostas observadas em condições normais de crescimento.

Sementes foram acondicionadas em tubos do tipo Falcon, dispostos verticalmente sob temperatura ambiente por 24 horas. Após esse período, a solução foi descartada e o excesso retirado com papel toalha. Em seguida, as sementes foram transferidas para placas de Petri (15 cm de diâmetro), acondicionadas em câmara de crescimento do tipo BOD (Forma Scientific, Inc, Ohio, EUA), sob fotoperíodo de 12/12 horas (dia/noite), temperatura 25/16 °C (dia/noite), umidade relativa $65 \pm 5 \%$ e intensidade de luz durante o período luminoso de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, por um período de sete dias, e posteriormente transferidas para casa de vegetação, na Universidade Federal de Viçosa (20° 45'S, 42° 15' W), Viçosa, Minas. Os vasos plásticos utilizados tinham capacidade de 3,5 L. O substrato comercial utilizado foi Tropstrato HT® e recebeu adubação de 15 g NPK granulado 4:14:8 (equivalente a 4% de $(\text{NH}_4)^+(\text{NO}_3)$, 14% de P_2O_5 , 8% de K_2O) por vaso.

2.2. Aplicação do estresse por deficiência hídrica

Após 3 semanas de cultivo em casa de vegetação, em condições semi-controladas, parte das plantas foi mantida sob irrigação periódica (controle) e outra parte foi submetida a deficiência hídrica (DH), mediante suspensão total da irrigação. Plantas do tratamento controle foram irrigadas diariamente a fim de manter-se a umidade do substrato dos vasos próxima à capacidade de campo, até o fim do experimento. As avaliações fisiológicas, bem como coletas de folhas e raízes para análises bioquímicas, foram efetuadas quando o potencial hídrico de pelo menos 50% das plantas de cada tratamento atingiu -1,5 MPa.

2.3. Determinação do *status* hídrico da planta

O *status* hídrico das plantas submetido à restrição hídrica, assim como as plantas que tiveram a irrigação mantida, foi acompanhado durante o período de restrição por meio do uso de câmara de pressão do tipo Scholander (modelo 1000, PMS Instruments, Albany, NY, USA) na antemanhã (3:00 - 5:30 horas). Para tal, foi utilizado o penúltimo folíolo da quarta folha do ápice para a base, cortado na inserção do peciólulo, sendo imediatamente colocado na câmara para aferição do potencial hídrico (Ψ_w) (Scholander *et al.*, 1964). O *status* hídrico foi também quantificado através do teor relativo de água (TRA) (Cairo 1995). Após as avaliações não destrutivas discos de folhas localizadas na

base, meio e ápice da planta foram coletados e posteriormente pesados para determinação da massa fresca (MF) e mantidos em placas de Petri contendo água destilada por quatro horas. Após esse período, os discos foram secos, com auxílio de papel toalha, para que a umidade externa fosse removida e, em seguida, foram novamente pesados para obtenção da massa túrgida (MT). Posteriormente, os discos foram levados à estufa de ventilação forçada, em temperatura de 65 °C, para obtenção da massa seca (MS). De posse da massa fresca, túrgida e seca, a determinação do TRA foi realizada através da equação abaixo:

$$TRA (\%) = \frac{MF - MS * 100}{MT - MS}$$

2.4. Análises biométricas

Os parâmetros de crescimento analisados foram: altura, massa seca da parte aérea (folhas e caule), massa seca da raiz, área foliar total e área foliar específica. Após a coleta, as amostras foram imediatamente levadas à estufa com ventilação forçada a 65 °C para obtenção da massa seca (MS) após peso constante. O crescimento das plantas foi monitorado a cada dois dias. Para tanto, a altura das plantas foi quantificada com auxílio de uma régua milimétrica desde a altura do colo até a gema apical durante todo o experimento. Para a determinação da área foliar específica (AFE), nove discos foliares de 14,1 cm² foram secos em estufa a 65 °C. A área foliar total (AFT) foi estimada a partir da AFE utilizando a massa seca de todas as folhas. A determinação de ambas AFE e AFT foi realizada seguindo protocolo descrito (Mielke *et al.*, 1995). A AFE foi calculada utilizando a fórmula:

$$AFE (cm^2 g^{-1}) = \frac{\text{área foliar dos discos (cm}^2\text{)}}{\text{massa seca dos discos (g)}}$$

2.5. Análises dos parâmetros fotossintéticos e fluorescência da clorofila *a*

A taxa de assimilação líquida do carbono (*A*, CO₂ μmol m⁻² s⁻¹), a condutância estomática ao vapor de água (*g_s*, mol H₂O m⁻² s⁻¹), a taxa de transpiração foliar (*E*), a concentração interna de CO₂ (*C_i*, μmol CO₂ mol⁻¹), bem como a externa (*C_a* μmol CO₂ mol⁻¹) foram medidas simultaneamente aos parâmetros de fluorescência da clorofila *a*, no primeiro folíolo da terceira folha, contada a partir do ápice. Para tal utilizou-se um analisador de gases a infravermelho em sistema aberto (IRGA – *Infrared Gas Analyzer*), dotado de uma câmara de área amostral de 2 cm², modelo LI 6400XT (LI-COR,

Lincoln, NE, EUA), com fluorômetro acoplado (LI-6400-40, LI-COR Inc.). As medições foram realizadas entre 8:00 e 12:00 horas, sob irradiância de 1000 $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, condição padrão de CO_2 de 400 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ e sem controle da temperatura da câmara do IRGA. A quantidade de luz azul aplicada foi de 10% da densidade do fluxo fotossintético para maximizar a abertura estomática. A respiração no escuro (R_d) foi determinada durante o período de escuro (entre 21:00 e 01:00 h) utilizando-se o mesmo equipamento descrito acima.

Para a determinação da fluorescência da clorofila *a* foi utilizado um fluorômetro acoplado ao IRGA no mesmo momento de medição da R_d . O folíolo foi inicialmente submetido a um pulso de luz vermelho-distante (1-2 $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), para a determinação da fluorescência inicial (F_0). Em seguida, para a estimativa da fluorescência máxima emitida (F_m) foi aplicado um pulso de luz saturante, com irradiância de 6000 $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e duração de 1 s. A fluorescência mínima de folhas adaptadas à luz (F_0') e a fluorescência máxima da clorofila (F_m') foram determinadas utilizando o mesmo equipamento concomitantemente a coleta dos dados de trocas gasosas. A eficiência fotoquímica máxima do FSII (F_v/F_m), da eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de reação abertos do FSII (F_v'/F_m'), dos coeficientes de extinção fotoquímica (qL) e não-fotoquímica (NPQ) e da taxa de transporte de elétrons (ETR), foram estimados conforme DaMatta e Rena (2002)

2.6. Ensaios bioquímicos

As folhas em que foram analisadas as trocas gasosas e fluorescência (conforme descrito no tópico anterior) foram coletadas para os ensaios bioquímicos. Todo o material vegetal foi coletado e rapidamente congelado em nitrogênio líquido e, em seguida, armazenado a -80 °C para análises posteriores.

2.7. Extração etanólica

Alíquotas de aproximadamente 25 mg de massa fresca foram maceradas em nitrogênio líquido e posteriormente submetidas à extração etanólica, a quente, pela adição de 250 μL de álcool etílico a 98% aos microtubos de 1,5 mL contendo o material macerado. As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 20 min a 80 °C sob agitação de 822 g. Após esse período os microtubos foram centrifugados a 17,000 g por 10 min a temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi coletado e armazenado em um novo tubo de 1,5 mL. O precipitado resultante foi submetido a outras duas extrações

utilizando álcool etílico 80% e 50% seguindo o mesmo procedimento descrito acima. Os sobrenadantes obtidos nestas etapas foram colocados no mesmo microtubo sendo então separados do precipitado resultante, porém ambos foram armazenados a -20 °C para análises posteriores dos metabólitos.

2.8. Teores de clorofila

Os teores de clorofila das folhas foram determinados no extrato etanólico conforme Porra *et al.*, (1989), com a utilização de um leitor de microplacas (Opit Max Tunable Microplate Reader), em absorvância de 645 e 665 nm. De posse dos resultados das absorvâncias foram calculados os teores de clorofila *a* e *b*, conforme as equações abaixo:

$$\text{Clorofila } a = 5,21 * \text{Abs665} - 2,07 * \text{Abs645}$$

$$\text{Clorofila } b = 9,29 * \text{Abs645} - 2,74 * \text{Abs665}$$

E os teores de clorofilas totais foram normalizados pelo peso fresco da amostra.

2.9. Determinação dos teores de aminoácidos totais

O conteúdo de aminoácidos totais foi quantificado de acordo com (Gibon *et al.*, 2004). Para tanto, em uma microplaca adicionou-se 15 µL do extrato etanólico, 35 µL de etanol 70%, 50 µL de tampão citrato pH 5,2 acrescido de ácido ascórbico 0,2 % (p/v) e 100 µL de ninhidrina 1% (p/v) em etanol 70% (v/v), em cada poço. A microplaca foi incubada no escuro por 20 min a 95 °C e centrifugada por 15 segundos a 17,000 *g*. Posteriormente, foi feita a leitura da placa no comprimento de onda de 570 nm. Para a determinação de aminoácidos totais fez-se a curva de calibração utilizando leucina como padrão. Os dados obtidos foram expressos em µmol g⁻¹ de MF (massa fresca).

2.10. Determinação do conteúdo de açúcares

Os teores de glicose, frutose e sacarose foram determinados segundo metodologia descrita por Fernie *et al.*, 2001. Para a reação foi preparada uma mistura (meio de reação) contendo tampão HEPES/KOH 100 mM com MgCl₂ 30 mM pH 7, ATP 118 mM, NADP⁺ 48,4 mM, e 56 unidades de desidrogenase da glicose-6-fosfato - G6PDH (5 mg ml⁻¹). Foram adicionados em cada poço de uma microplaca 160 µL do *mix*, 15 µL do extrato e 35 µL de etanol a 80%. As leituras cinéticas das absorvâncias foram feitas a 340 nm, com intervalos de um minuto entre as leituras. Após a estabilização da densidade ótica, adicionou-se 5 µL das seguintes enzimas: hexocinase

(1,5 U por reação), fosfoglicose isomerase (0,7 U por reação) e invertase (5 U por reação) com intervalos de 20 minutos entre cada aplicação. Os resultados expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ foram estimados segundo equação baseada na lei de Lambert-Beer:

$$\mu\text{mol NADPH} = \frac{\Delta\text{OD}}{(2,85 \times 6,22)}$$

2.11. Determinação dos conteúdos de malato e fumarato

Os conteúdos de malato e fumarato foram determinados a partir da metodologia descrita por Nunes-Nesi *et al.* (2007). Para a reação foi preparada uma mistura (meio de reação) contendo 50 μL de tampão Tricina/KOH 0,2 M com MgCl_2 10 mM pH 9,0, 10 μL de brometo de metiltiazolildifeniltetrazólio - MTT (10 mM), 10 μL de NAD^+ (60 mM), 2 μL de fenazinaetosulfato - PES (20 mM), 5 μL de Triton X-100 10% (v/v), 3 μL de H_2O . Em uma microplaca adicionou-se 80 μL do meio de reação juntamente a 10 μL do extrato etanólico e 10 μL de ETOH a 98%. As leituras foram feitas a partir de um leitor de microplacas a 570 nm, com intervalo entre leituras de um minuto. Uma vez estabilizado a densidade ótica, foram adicionados sucessivamente aos poços 5 μL de malato desidrogenase (1 U por reação) e, após nova estabilização da OD, 5 μL de fumarase (0,1 U por reação). Para obtenção dos resultados, expressos em $\mu\text{mol g}^{-1}$ de MF, foi feita uma curva de calibração para malato e fumarato.

2.12. Determinação dos teores de proteínas solúveis totais

O conteúdo de proteínas solúveis totais foi determinado conforme previamente descrito (Gibon *et al.*, 2004), utilizando-se o precipitado resultante da extração etanólica. A fração insolúvel em etanol foi ressuspensa em 400 μL de NaOH 0,1 M e então homogeneizada com o auxílio de um vortex. Os microtubos foram incubados por uma hora a 95 °C sob agitação de 21,023 g. Após, os microtubos ficam em gelo durante 5 minutos para cessar a reação de extração a quente. Uma alíquota de 5 μL do sobrenadante foi então retirada dos microtubos e adicionada a microplaca já contendo 180 μL da solução de Bradford (diluição 1:5 do reagente) em cada poço. O comprimento de onda utilizado para leitura pontual da microplaca foi de 595 nm. O resultado foi obtido a partir de curva de calibração em que se utilizou albumina sérica bovina (BSA) como padrão, sendo posteriormente expresso em mg g^{-1} MF.

2.13. Determinação do conteúdo de amido

A concentração de amido foi determinada partir da metodologia descrita por Fernie *et al.*, 2001, a partir do mesmo extrato utilizado para quantificação de proteínas precipitado resultante da extração etanólica mais NaOH 0,1 M). Para neutralização do extrato utilizado foi adicionado 70 μL de ácido acético 1 M, seguindo-se de vigorosa homogeneização. Preparou-se uma mistura (*mix* de reação) para a hidrólise do amido contendo as enzimas amiloglicosidase (0,14 unidades μL^{-1}) e α -amilase (0,01 U μL^{-1}) ressuspensas em acetato de sódio 0,5 M pH 4,9. Em cada poço de uma microplaca, contendo 40 μL da suspensão feita a partir do precipitado da extração etanólica, foi adicionado 60 μL do *mix* de hidrólise do amido. A microplaca foi vedada com fita de alumínio (3M Modelo 425®) e então incubada por uma hora a 56°C com leve agitação. Posteriormente, a microplaca seguiu para centrifugação de 15 segundos a 13500 rpm, e então foram retirados 25 μL da suspensão e transferidos para uma segunda microplaca contendo 165 μL do meio de reação composto por tampão Hepes/KOH 1M pH 7,0 MgCl₂ 3 mM, ATP 118 mM, NADP⁺ 48,4 mM e 56 unidades de desidrogenase da glicose-6-fosfato– G6PDH (0,7 unidades μL^{-1}). A determinação dos teores de glicose (amido hidrolisado) foi realizada com o uso de um leitor de microplacas, com leitura a 340 nm, com intervalos de 1 minuto entre as leituras. Após a estabilização da densidade ótica, 5 μL de hexocinase (2 unidades por reação). O conteúdo de amido foi então calculado de acordo com a equação utilizada para a determinação de glicose e os resultados expressos em μmol de glicose por g^{-1} de MF.

2.14. Determinação das enzimas envolvidas no metabolismo antioxidativo

Para avaliar a atividade de enzimas do sistema antioxidante, 50 mg de massa fresca de folhas foram homogeneizadas em meio de extração constituído por tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, EDTA 0,1 mM, DTT 2 mM, ácido ascórbico 20 mM e polivinilpirrolidona – PVPP 4% (p/v). O extrato enzimático bruto foi utilizado para determinação da atividade das enzimas catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) segundo descrito previamente (Cakmak e Horst, 1991). Para a quantificação da atividade da APX, foram adicionados, em cada poço de uma microplaca, 5 μL do extrato enzimático ao meio de reação contendo 15 μL de tampão fosfato de potássio 1 M, pH 6,0, 1,5 μL de ácido ascórbico 200 mM e 275,5 μL de H₂O. A reação foi iniciada com adição de 3 μL de H₂O₂. A APX foi determinada estimando-se a taxa de oxidação do ascorbato nos três primeiros minutos da reação, a 290 nm, com intervalo de cinco

segundos entre as leituras. A atividade foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e os resultados expressos em $\mu\text{moles de ácido ascórbico min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína. A atividade da CAT foi determinada a partir de $10 \mu\text{L}$ do extrato enzimático bruto. Em uma microplaca contendo o extrato foram adicionados o meio de reação composto de $15 \mu\text{L}$ de tampão fosfato de potássio 1 M , $\text{pH } 7,0$, $245 \mu\text{L}$ de H_2O . A reação foi iniciada com a adição de $30 \mu\text{L}$ de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As leituras foram feitas em 240 nm , por três minutos, com intervalos de cinco segundos entre leituras, observando-se o decréscimo na concentração de H_2O_2 . A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $16,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e expressa em $\mu\text{moles de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

2.15. Determinação do conteúdo de prolina

O conteúdo de prolina foi determinado segundo Bates *et al.* (1973). Para tal, 30 mg de massa fresca macerada foi liofilizada por 48 horas. Após, 500 mL de água ultrapura foi adicionado aos tubos contendo o material liofilizado, sendo então levados ao aquecimento por 90° , por 1 hora sob agitação de $21,023 \text{ g}$. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas e os sobrenadantes coletados para obtenção do extrato total. Em função da alta concentração de prolina acumuladas em plantas de tomate sob deficiência hídrica, usou-se $500 \mu\text{L}$ de sobrenadante para as amostras controle, e $50 \mu\text{L}$ de sobrenadante em adição a $450 \mu\text{L}$ de água para as amostras de plantas sob deficiência hídrica. Após, adicionaram-se $500 \mu\text{L}$ de nihindrina ácida e $500 \mu\text{L}$ de ácido acético glacial ao tubos de ensaio com tampa, que foram hermeticamente fechados, agitados em vortex e depois submetidos a banho-maria por 1 hora em temperatura média de 85°C . Após o tempo determinado, a reação em banho-maria foi interrompida em gelo. As amostras foram levadas para uma capela de exaustão, onde $500 \mu\text{L}$ de tolueno foi adicionado às amostras, para que a substância cromófora fosse extraída e então formada um complexo colorido, variando de rosa a vermelho. As amostras foram então vigorosamente agitadas em vortex por 20 segundos e ao alcançarem a temperatura ambiente, com o auxílio de uma pipeta pasteur, a fase não aquosa foi retirada, constituída por cromóforo e tolueno, situada na parte superior da amostra. A porção cromófora é então transferida a uma cubeta de quartzo e utilizada em um espectofotômetro, que através de leituras a 520 nm determinou-se conteúdo de prolina. O conteúdo foi calculado a partir de uma curva padrão estabelecida usando diferentes concentrações de prolina.

2.16. Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com doze repetições para cada tratamento: sem *priming*, *priming* com água destilada, *priming* com 25 μM de selenato de sódio, e 250 μM , totalizando 48 plantas, sendo metade delas submetidas ao estresse hídrico e a outra metade irrigadas regularmente. Foram utilizadas 12 plantas por tratamento referente às dosagens de selenato, sendo 6 delas destinadas ao estresse hídrico e outras utilizadas como controle para o déficit hídrico. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, para verificar diferenças estatísticas entre os tratamentos, as médias foram comparadas pelo teste de tukey a 5% de probabilidade ($P < 0,05$), com auxílio do software Assistat® (Silva & Azevedo, 2002).

3. RESULTADOS

3.1. Avaliação fenotípica de plantas tratadas com diferentes concentrações de Na_2SeO_4 via *priming* de sementes submetidas à deficiência hídrica.

Verificou-se que as plantas controle apresentaram sintomas visíveis de murcha logo nos primeiros dias após serem submetidas à deficiência hídrica (DH). Por outro lado, plantas submetidas ao *priming* com 250 μM de selenato de sódio, durante o mesmo período de seca (13 dias), não apresentaram sintomas de murcha tão aparentes quanto àquelas que não passaram pelo *priming* (Figura 1).



Figura 1. Imagem representativa de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) submetidas à restrição hídrica aos 21 dias após o transplante. Fotos foram obtidas no 13º dia após a suspensão da irrigação. Traço em branco representa a escala (17 cm).

Com o intuito de investigar melhor esses fenótipos, o *status* hídrico das plantas foi determinado durante 16 dias após aplicação dos tratamentos (Figura 2). É importante mencionar que o número de dias sob deficiência hídrica necessário para que todas as plantas alcançassem o potencial hídrico (Ψ_w) de -1,5 MPa foi variável (Figura 2). Assim, observou-se que plantas que passaram pelo *priming* com 250 μM atingiram o Ψ_w próximo a -1,5 MPa 16 dias após a suspensão da irrigação, enquanto as demais atingiram o mesmo Ψ_w 13 dias após (Figura 2). Em síntese, plantas tratadas com altas concentrações de *Se* (250 μM de Na_2SeO_4) necessitaram de um maior tempo para chegar ao Ψ_w desejado (Figura 2), sugerindo um papel mitigador do *Se* nas respostas à deficiência hídrica observada em tomate.

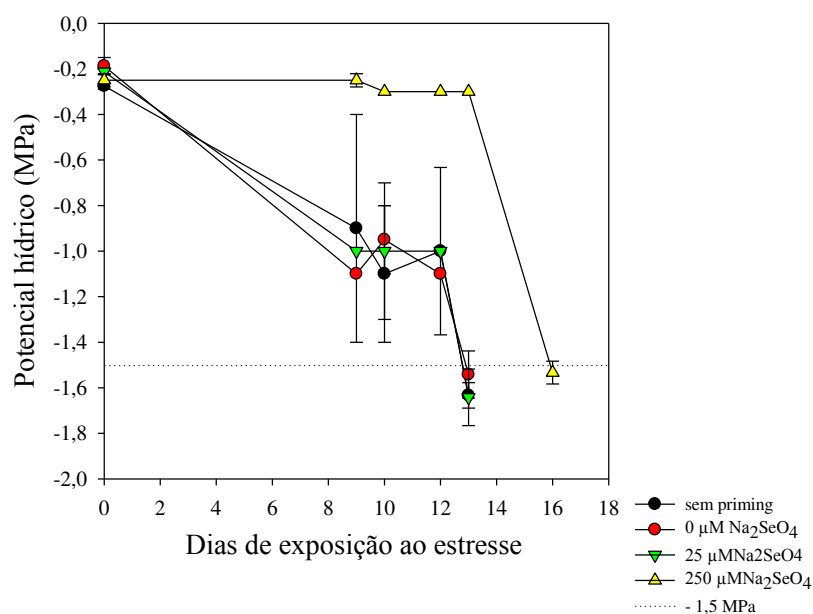


Figura 2. Potencial hídrico (Ψ_w) em folhas de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Santa Clara) submetidas ao *priming* de sementes com diferentes concentrações de selenato de sódio, água destilada e sem *priming* (controle) durante os dias de exposição ao estresse hídrico. Linha pontilhada representa, graficamente, o Ψ_w desejado para a coleta (-1,5 MPa), em função do tempo de exposição das plantas ao estresse até alcançarem o potencial desejado.

Adicionalmente, o *status hídrico* foi também determinado por meio do teor relativo de água (TRA) (Figura 3A). O TRA foi analisado no mesmo dia determinado para as coletas bioquímicas, ou seja, quando as plantas sob limitação hídrica atingissem aproximadamente Ψ_w -1,5 MPa. De modo interessante, plantas controle, plantas tratadas com *priming* com água destilada e com 25 μM de selenato de sódio alcançaram esse Ψ_w 13 dias após a suspensão da irrigação, ao passo que em plantas tratadas com *priming* de 250 μM de selenato de sódio esse Ψ_w só foi atingido decorridos 16 dias (Figura 2). O TRA não foi alterado entre plantas tratadas com *priming* seja com Se ou com água destilada e plantas não tratadas (sem *priming*); porém, o TRA foi menor nas plantas submetidas à deficiência hídrica em relação às irrigadas (Figura 3 A). Da mesma forma, o Ψ_w final diminuiu nas plantas submetidas à limitação hídrica; porém, uma vez que essa análise se deu a um mesmo valor de Ψ_w para os diferentes tratamentos, não variou entre as plantas tratadas com *priming* de Se e as plantas tratadas com *priming* de água destilada e as que não passaram pelo *priming* (Figura 3B).

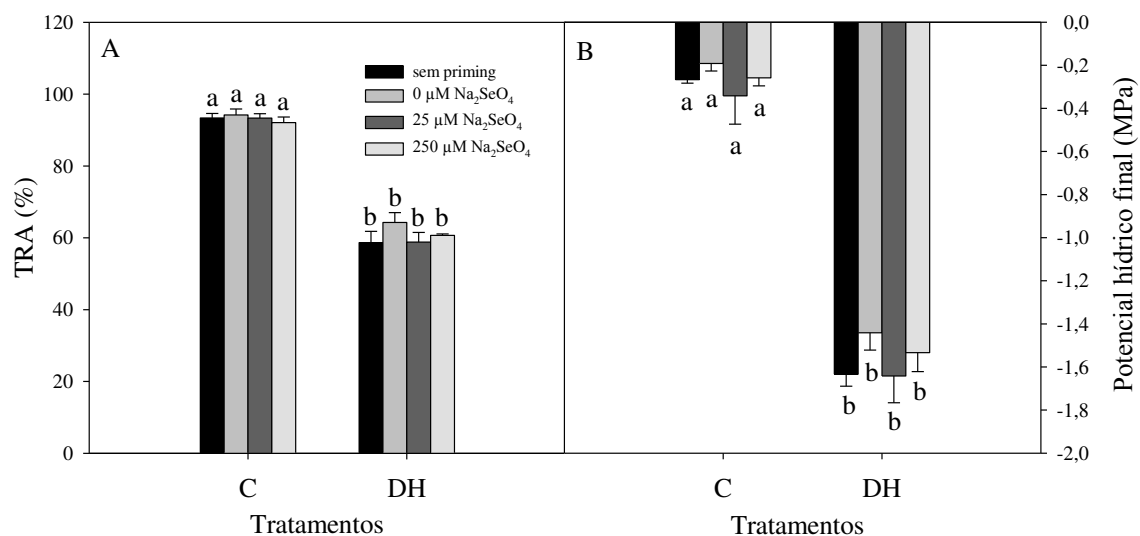


Figura 3. Alterações no *status* hídrico de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) tratadas com *priming* de sementes com diferentes concentrações de selenato de sódio, água destilada e sem *priming* (controle), submetidas à suspensão da irrigação 21 dias após o transplante. Teor relativo de água ao final da exposição de cada tratamento à deficiência hídrica (A); potencial hídrico (Ψ_w) final das folhas. Medições foram realizadas no dia da coleta, que ocorreu quando as plantas alcançaram o Ψ_w desejado (-1,5 MPa). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste Tukey ($P \leq 0,05$).

3.2. Análises biométricas de plantas tratadas com diferentes concentrações de Na₂SeO₄ via *priming* de sementes submetidas à deficiência hídrica

Priming com Se e água destilada em sementes não alteraram os parâmetros biométricos referentes à massa seca de plantas tanto em condições de irrigação adequada quanto de restrição hídrica (Figura 4A-E). O mesmo ocorreu para a razão entre raiz e parte aérea (Figura 4D). O conteúdo de biomassa alocada nas folhas, dentre as plantas irrigadas, foi menor nas plantas tratadas com 250 μM de selenato em relação àquelas tratadas com 25 μM e 0 μM (água destilada; Figura 4F). Observou-se que a alocação de biomassa no caule foi maior em plantas com 25 μM de selenato comparadas àquelas com 250 μM, também entre as plantas irrigadas (Figura 4F). Já a biomassa alocada na raiz não apresentou diferenças entre os tratamentos, nem em

condições de irrigação adequada nem em condições de deficiência hídrica (Figura 4F).

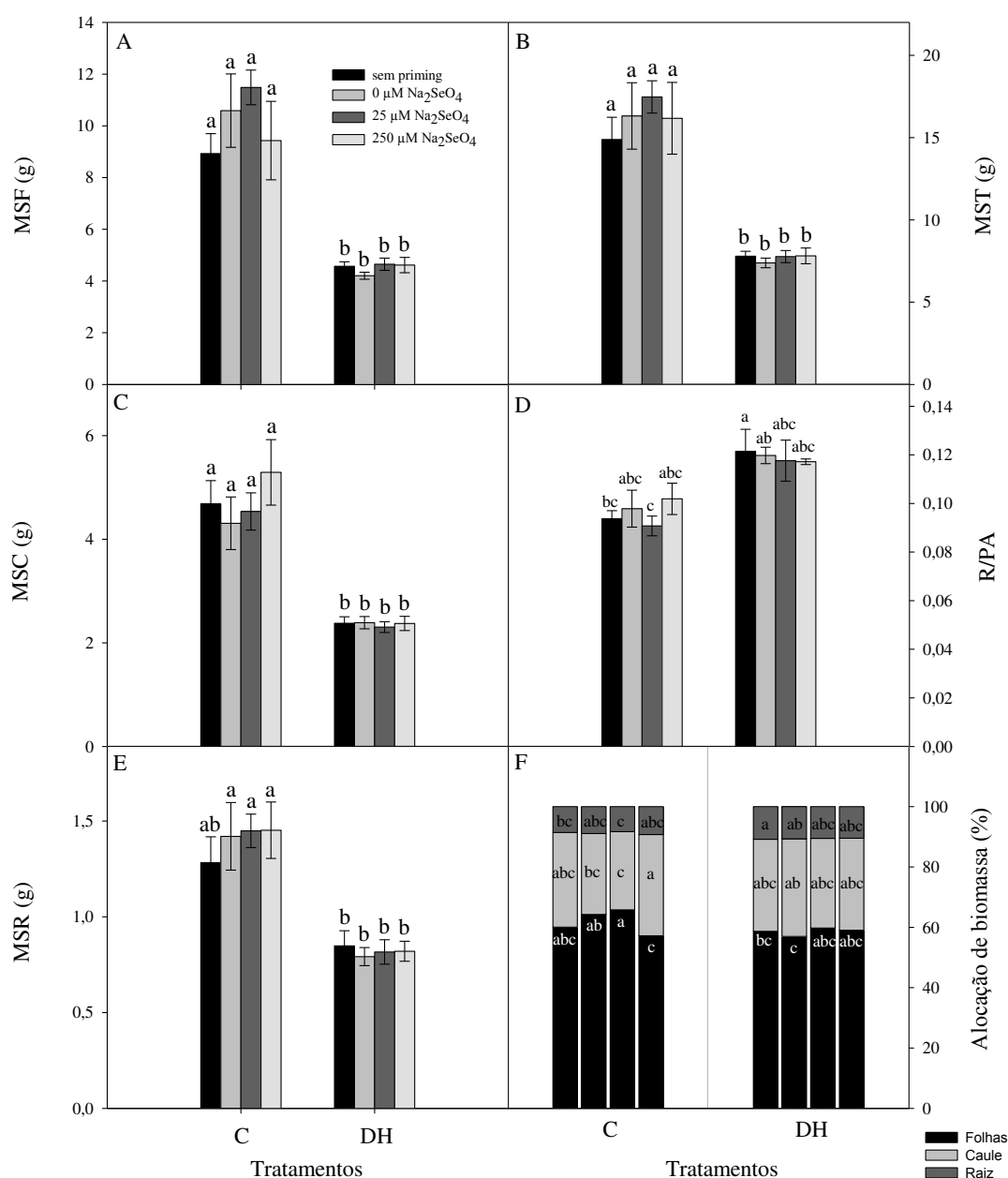


Figura 4. Variação nos parâmetros biométricos referentes à massa seca de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) tratadas com *priming* de sementes com diferentes concentrações de selenato de sódio, água destilada e sem *priming* (controle), submetidas à suspensão da irrigação aos 21 dias após o transplantio. A coleta do material vegetal utilizado nas medições ocorreu quando as plantas alcançaram o Ψ_w desejado (-1,5 MPa). Massa seca das folhas (MSF) (A); massa seca total (MST) (B); massa seca do caule (MSC) (C); Razão entre raiz e parte aérea (R/PA) (D); massa seca da raiz (MSR) (E); alocação de biomassa (F). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste Tukey ($P \leq 0,05$).

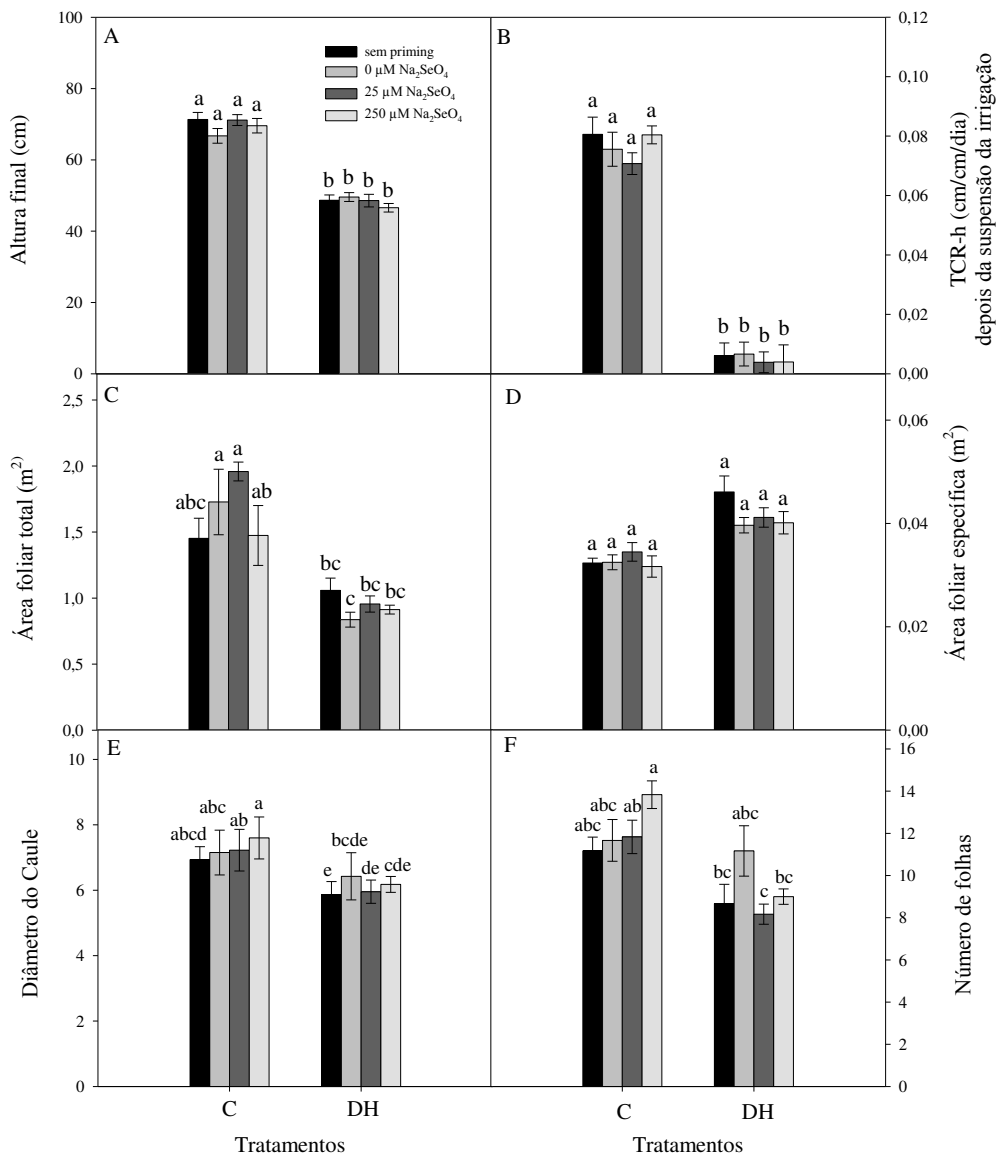


Figura 5. Variação nos parâmetros biométricos referentes à altura, área foliar, diâmetro do caule e número de folhas em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Santa Clara). Detalhes adicionais sobre os tratamentos e estatísticas estão apresentados na Figura 3. Altura final (A); taxa de crescimento relativo em altura (TCR-h) (B); área foliar total (AFT) (C); área foliar específica (D); diâmetro do caule (E); número de folhas (F).

A altura final foi menor nas plantas submetidas ao estresse por deficiência hídrica em relação às irrigadas (Figura 5A). Porém, não se observaram diferenças entre as plantas tratadas com *Se* e água destilada em relação às plantas cujas sementes não sofreram *priming*. Padrão similar, em que diferenças significativas foram observadas apenas entre as plantas irrigadas e aquelas submetidas à limitação hídrica, foi observado também para a taxa de crescimento em altura e área foliar (Figura 5A e C). A área foliar

específica manteve-se inalterada entre os tratamentos tanto em condições de irrigação adequada como durante deficiência hídrica (Figura 5D). Variações entre o diâmetro do caule e número de folhas foram encontradas sem, no entanto, apresentar um padrão específico e relevante (Figuras 5E- F).

3.3. O Selênio não altera os parâmetros de fluorescência e trocas gasosas em plantas de tomate nem em condições ótimas nem situações de deficiência hídrica.

A eficiência máxima do FSII (F_v/F_m) permaneceu inalterada entre os diferentes tratamentos, tanto em condições de irrigação adequada, quanto em condições de deficiência hídrica assim como o rendimento quântico efetivo do transporte de elétrons no FSIII (F_v'/F_m') (Figuras 5A-B). O coeficiente de extinção fotoquímica (qL) diminuiu nas plantas sob deficiência hídrica em relação àquelas irrigadas (Figura 5C) ao contrário do coeficiente de extinção não-fotoquímico (NPQ), que manteve-se inalterado, enquanto a taxa de transporte de elétrons diminuiu nas plantas submetidas ao estresse hídrico em relação às irrigadas (Figuras 5C- E).

Ao se avaliar os parâmetros de trocas gasosas, observou-se que a fotossíntese líquida (A) diminuiu em plantas sob deficiência hídrica, porém manteve-se inalterada entre as plantas com *priming* de *Se* e água destilada em relação às plantas sem *priming*. (Figura 7A). Comportamento semelhante foi observado também para a condutância estomática (g_s) (Figura 7B) e transpiração (E) (Figura 7C). A razão entre a concentração interna de CO_2 e a externa (C_i/C_a) permaneceu inalterada nas plantas tratadas com *priming* de água destilada, plantas tratadas com *priming* com 25 μM de selenato e plantas sem *priming* sob deficiência hídrica; porém, foi observado um aumento nesta razão durante o período de estresse em plantas submetidas ao *priming* com 250 μM de selenato (Figura 7D). A respiração no escuro (R_d) permaneceu inalterada tanto entre as plantas controle quanto entre aquelas sob deficiência hídrica (Figura 7E). Cumpre ressaltar que, mesmo sem diferenças estatísticas, houve uma tendência de aumentos na eficiência do uso intrínseco da água (EUA_i) em plantas tratadas com *priming* com 250 μM de selenato sob estresse por deficiência hídrica em relação às demais (Figura 6F).

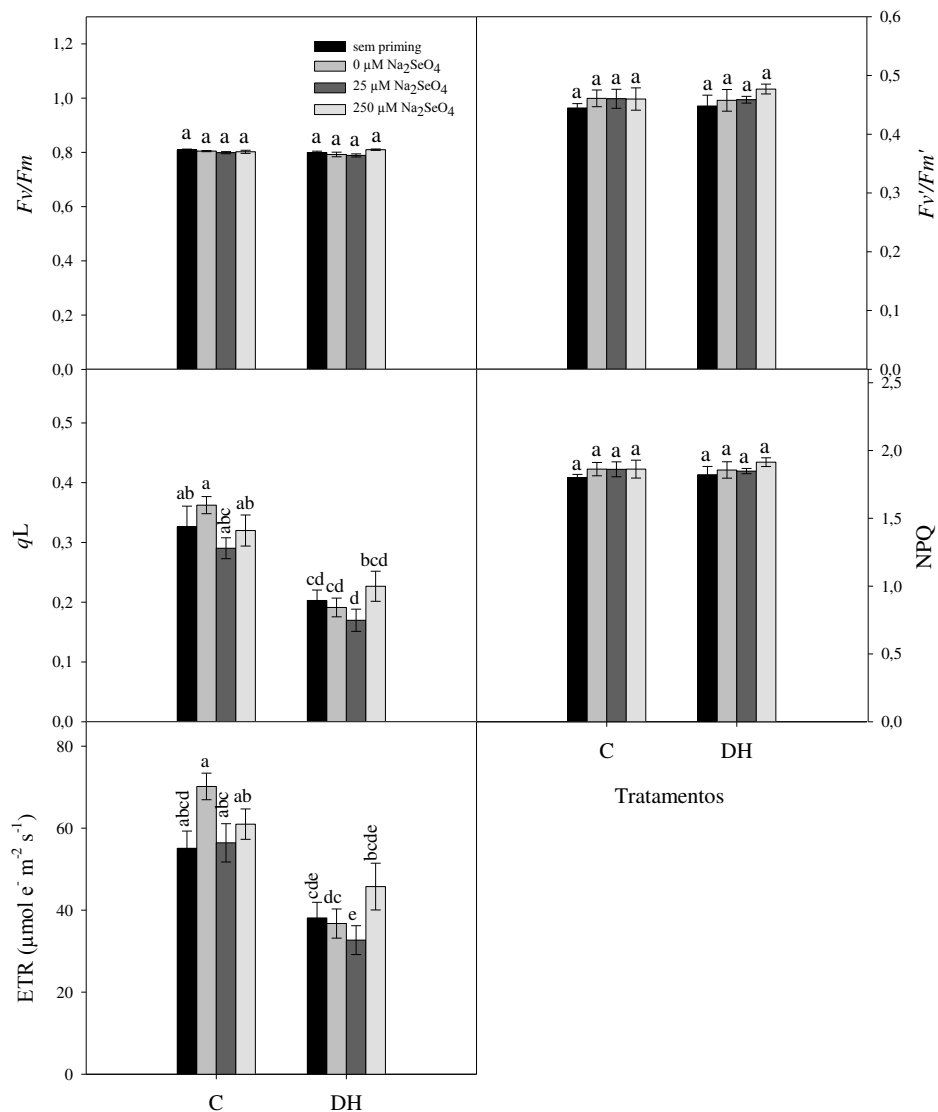


Figura 6. Variação nos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Santa Clara). Detalhes adicionais sobre os tratamentos e estatísticas estão apresentados na Figura 3. Eficiência fotoquímica máxima do FSII (F_v/F_m) (A); rendimento quântico efetivo do transporte de elétrons no FSII (F_v'/F_m') (B); coeficiente de extinção fotoquímica (q_L) (C); coeficiente de extinção não-fotoquímica (NPQ) (D) e; taxa de transporte de elétrons (ETR) (E).

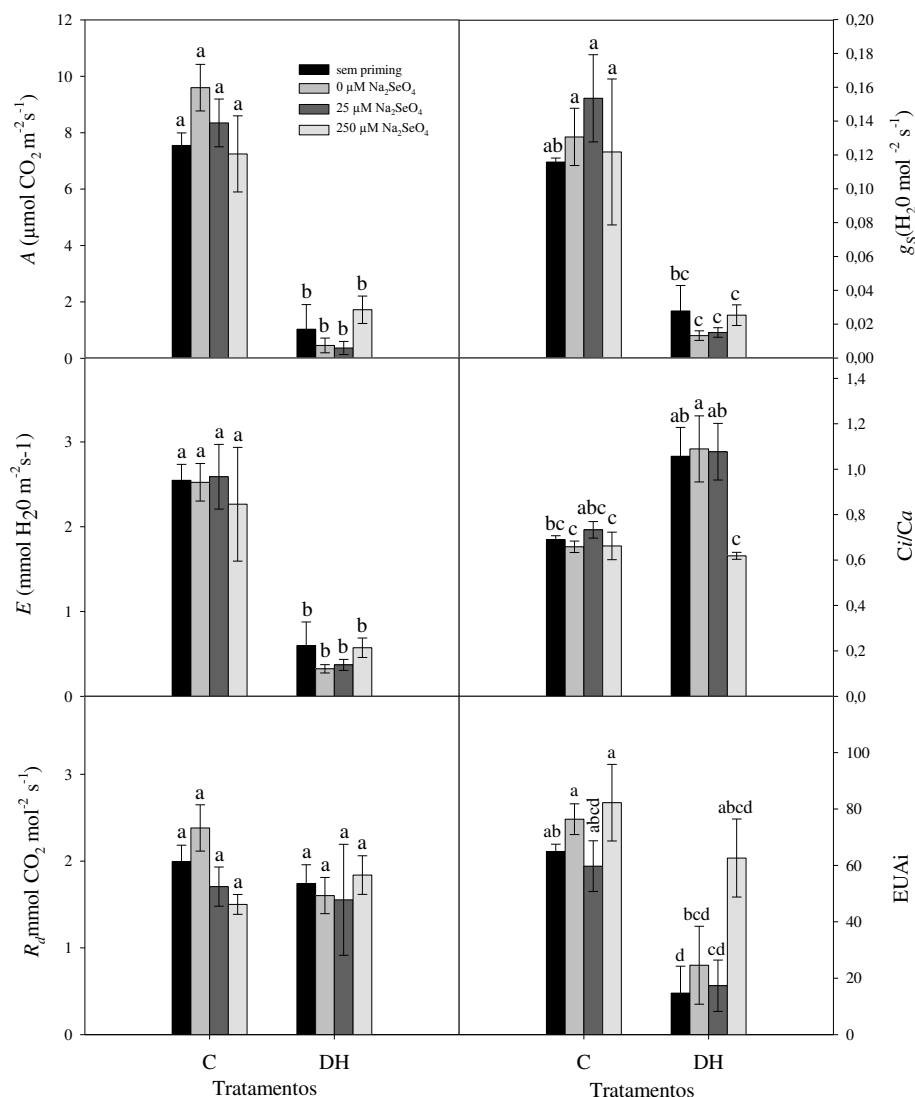


Figura 7. Variação nos parâmetros de trocas gasosas em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Santa Clara). Detalhes adicionais sobre os tratamentos e estatísticas estão apresentados na Figura 3. Fotossíntese líquida (A) (A); Condutância estomática (g_s) (B); Taxa de transpiração (E) (C); razão entre CO₂ interno e externo (C_i/C_a) (D); Taxa de respiração no escuro (R_d) (E) e; Eficiência intrínseca do uso da água (EUA_i) (F).

3.4. Aplicação de Se, via priming em sementes, afeta o metabolismo do Carbono e do Nitrogênio em tomate, sob deficiência hídrica.

Para verificar a influência do Se no metabolismo do N, foram quantificados os teores de clorofila *a* e *b* (Figura 8), aminoácidos e proteínas (Figura 9). Os teores de clorofila *a* diminuíram em plantas sob deficiência hídrica sem, no entanto variar entre plantas cujas sementes foram submetidas ou não ao *priming* (Figura 8A). Comportamento semelhante foi também notado para clorofila *b* (Figura 8B) e clorofila

total (Figura 8C). Por outro lado, a razão entre clorofilas *a* e *b* (Figura 8D) manteve-se inalterada entre as plantas cujas sementes foram tratadas com e sem *priming* tanto em condições ótimas de irrigação quanto em condições de déficit hídrico.

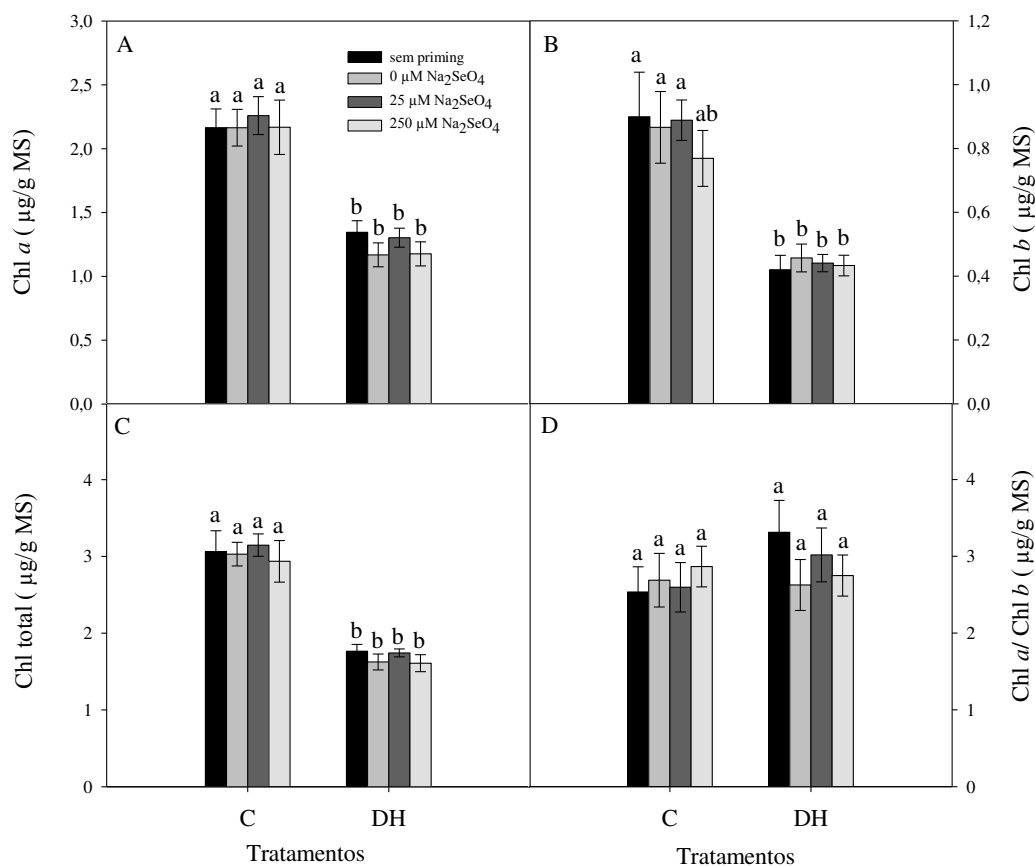


Figura 8. Teores de clorofila em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Santa Clara). Detalhes adicionais sobre os tratamentos e estatísticas estão apresentados na Figura 3. Clorofila *a* (Chl *a*) (A); clorofila *b* (Chl *b*) (B); Clorofila total (Chl total) (C) e razão entre clorofila *a* e clorofila *b* (Chl *a*/Chl *b*) (D).

Verifica-se, em condições de deficiência hídrica, aumentos significativos no conteúdo de proteínas em plantas cujas sementes não passaram pelo *priming*. Entre as plantas que passaram pelo *priming*, verifica-se uma tendência (sem diferenças estatísticas) de aumentos de proteínas em condições de déficit hídrico (Figura 9A). O conteúdo de aminoácidos aumentou em condições de deficiência hídrica em plantas cujas sementes foram ou não submetidas ao *priming* (Figura 9B).

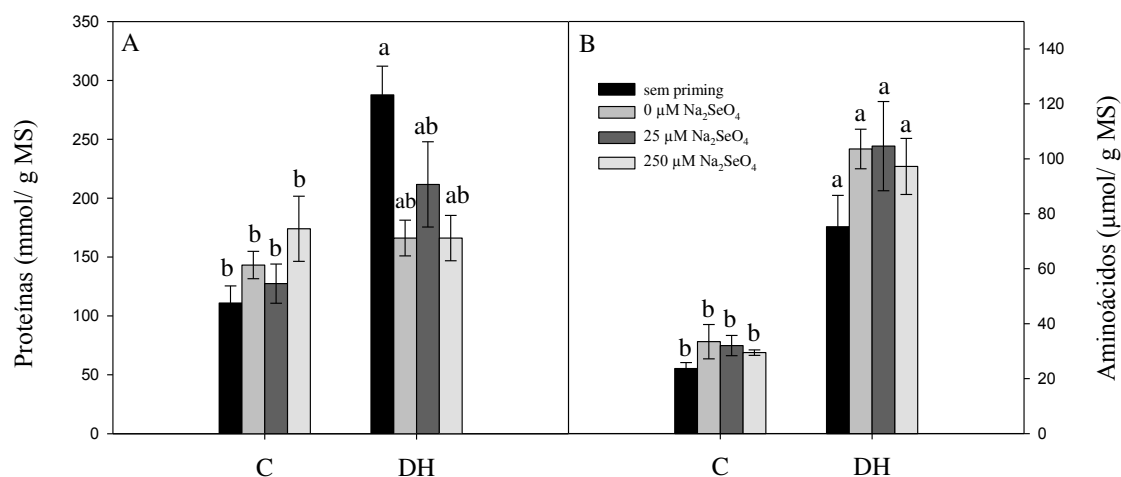


Figura 9. Alteração nos teores de metabólitos envolvidos no metabolismo do nitrogênio em folhas de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Santa Clara) Detalhes adicionais sobre os tratamentos e estatísticas estão apresentados na Figura 3. Proteínas (A); aminoácidos (B).

Verificaram-se aumentos nos conteúdos de glicose em resposta a deficiência hídrica, independentemente das plantas terem passado pelo *priming* ou não (Figura 10 A). Tendência a incrementos nos teores de frutose foi observada também em presença de estresse hídrico (Figura 10 B), porém, sem diferenças significativas. Os níveis de sacarose aumentaram significativamente em resposta ao estresse e os maiores níveis foram encontrados em plantas tratadas com *priming* de 25 μM de selenato sob déficit hídrico em relação às demais, independente das condições de irrigação (Figura 10 C). O conteúdo de amido decresceu em plantas submetidas a estresse hídrico, tratadas com *priming* ou não (Figura 10 D). O níveis de malato aumentaram nas plantas em função da suspensão da irrigação, não havendo, entretanto, diferenças significativas relacionadas entre as plantas sem *priming* e as demais (Figura 10 E). Interessantemente, os níveis de fumarato atingiram seus valores máximos em plantas tratadas com *Se* via *priming* em condições de deficiência hídrica.

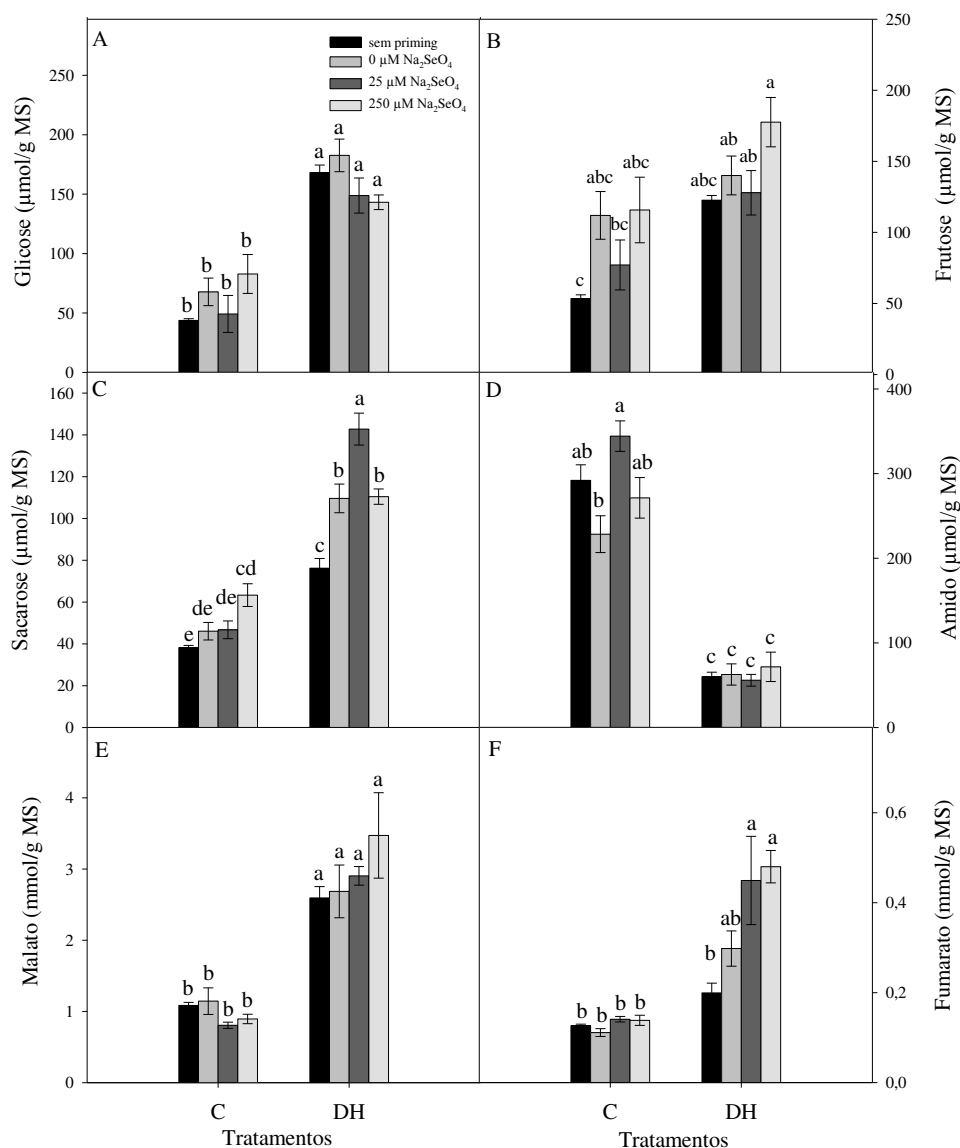


Figura 10. Alteração nos teores de metabólitos envolvidos no metabolismo do carbono em folhas de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv. Santa Clara). Detalhes adicionais sobre os tratamentos e estatísticas estão apresentados na Figura 3. Glicose (A); frutose (B); sacarose (C); amido (D); malato (E); fumarato. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si de acordo com o teste tukey ($p \leq 0,05$).

3.5. O Se não altera as atividades da APX e CAT em folhas de tomate em condições ótimas e de deficiência hídrica.

Apesar de uma tendência de aumento na atividade da CAT em plantas submetidas à limitação hídrica, não se observaram alterações na atividade dessa enzima em resposta ao *priming* ou a reduções na disponibilidade hídrica (Figura 11 A). Similarmente, embora uma tendência de aumento na atividade da APX seja visível em

plantas tratadas com *priming* de 250 μM de selenato em condições de estresse, em relação a plantas tratadas com o mesmo *priming* em condições de seca, mudanças na atividade dessa enzima não seguiram um padrão específico (Figura 11 B).

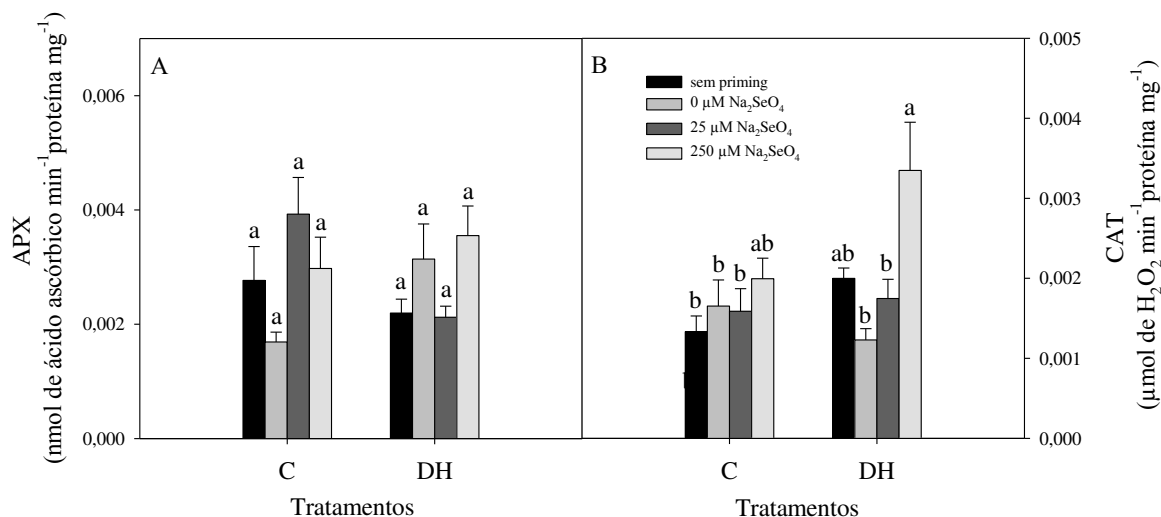


Figura 11. Variação no conteúdo de enzimas envolvidas no metabolismo antioxidativo e danos celulares em folhas de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Santa Clara) Peroxidase do ascorbato (APX) (A); catalase (CAT). Detalhes adicionais sobre os tratamentos e estatísticas estão apresentados na Figura 3

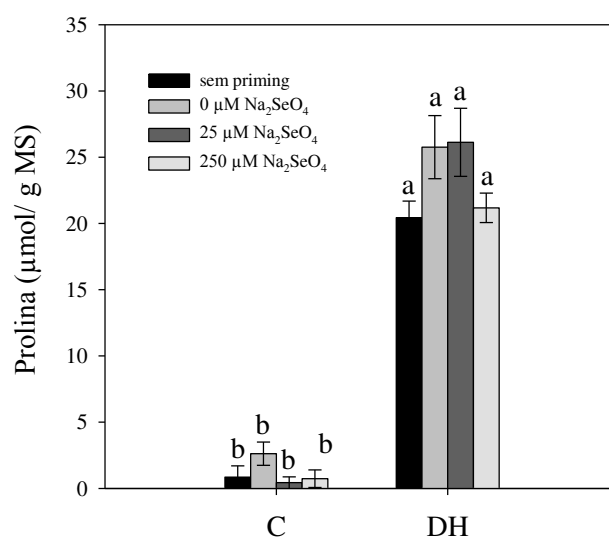


Figura 12. Variação no conteúdo de prolina em folhas de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Santa Clara). Detalhes adicionais sobre os tratamentos e estatísticas estão apresentados na Figura 3.

3.6. O *Se* não promoveu o acúmulo de prolina em folhas de tomate submetidas a estresse hídrico

O conteúdo de prolina nas plantas submetidas ao estresse por deficiência hídrica foi significativamente maior do que nas plantas mantidas irrigadas (Figura 12). É importante mencionar que este acúmulo não está relacionado ao *priming per se* tampouco ao *Se*, uma vez que plantas sem *priming* apresentaram valores similares às demais.

4. DISCUSSÃO

Evidências tem apontado o *Se* não apenas como um possível regulador do *status* hídrico vegetal (Ahmad *et al.*, 2015) mas também como capaz de aumentar a produção de biomassa (Hasanuzzaman e Fujita, 2011; Nawaz *et al.*, 2013). Tal fato se deve, muito possivelmente, ao aumento na atividade do metabolismo antioxidativo em plântulas sob déficit hídrico (Hasanuzzaman e Fujita, 2011; Yao *et al.*, 2013). Adicionalmente, a presença de *Se* promoveu o crescimento e fotossíntese em plantas de tomate sob estresse salino (Diao *et al.*, 2014). Porém, pouco ou nada se sabe acerca dos efeitos do *priming* em sementes realizado com *Se* em plantas de tomate sob deficiência hídrica. Os resultados aqui obtidos indicam que o *Se* possa, até certo ponto, melhorar o *status* hídrico vegetal. Assim, plantas cujas sementes passaram pelo *priming* com 250 μM de selenato de sódio atingiram o Ψ_w próximo a -1,5 MPa 16 dias após a suspensão da irrigação (Figura 2). Por outro lado, plantas cujas sementes não passaram pelo *priming* e as que passaram pelo mesmo tratamento só que com água destilada e concentrações inferiores de *Se* (25 μM) atingiram o mesmo Ψ_w após 13 dias (Figura 2). Tendo em vista que essa manutenção do *status* hídrico ocorreu sem alterações na fluorescência da clorofila *a*, nem em trocas gasosas e nem na atividade enzimática é plausível sugerir que mecanismos outros de proteção devam ser fundamentais para garantir o *status* hídrico em tomateiros.

Em experimentos anteriores (vide capítulo I) tendências a ganhos em biomassas foram atribuídos à suplementação com *Se*. Todavia, nas condições aqui estabelecidas em que a restrição hídrica culminou em estresse severo (plantas chegaram ao potencial hídrico de -1,5 MPa), ganhos de biomassa não foram observados em presença de *Se* (Figura 4). Adicionalmente, plantas de tomate com 34 dias de idade e em condições ótimas não apresentaram incrementos em biomassa em presença de *Se* (Figura 4). Registre-se que aumentos na biomassa atribuídos à suplementação com *Se* foram

encontrados em plântulas de *Stanleya pinnata* e *Brassica juncea* tanto em condições ótimas quanto em seca moderada; todavia, não foram observadas diferenças em condições de déficit hídrico mais severo (Pittarello, 2012). Esses resultados parecem explicar, ao menos parcialmente, os resultados aqui obtidos no que respeita o limitado efeito do *Se* para incrementos em massa seca. Nesse contexto, é plausível sugerir que os efeitos do *Se* na mitigação dos impactos de estresses deva ser mais evidente em estresses moderados e em plântulas ou plantas jovens. Não obstante, estudos voltados ao acompanhamento dos efeitos do *Se* ao longo do desenvolvimento vegetal, tanto em condições ótimas, bem como durante restrição hídrica, podem se traduzir em uma maneira eficaz de se conhecer mais acerca dos impactos do *Se* em tomate, particularmente em resposta a deficiência hídrica.

A captação e acumulação de *Se* é determinada pela habilidade que a planta apresenta para absorver e metabolizar o *Se*. Saliente-se que o aumento na acidez, óxidos e hidróxidos de ferro, matéria orgânica e teor de argila (Mikkelsen *et al.* 1989; Kabata-Pendias, 2001) e precipitação (Zhao *et al.*, 2007) podem diminuir a biodisponibilidade do *Se* para os vegetais. Tendo em vista que os mais diversos fatores podem afetar a suplementação do *Se* via aplicação no solo, o tratamento em sementes, e.g. *priming* ou revestimento de sementes com *Se* (Bittman *et al.*, 2000), podem minimizar os efeitos do solo na assimilação desse micronutriente além de promover a biofortificação deste nas partes comestíveis da planta (Nancy e Arulselvi, 2014). Entretanto, a aplicação foliar é considerada ainda o método mais eficaz para uma melhor translocação de *Se* nas plantas, bem como na tolerância ao estresse, quando comparado à aplicação no solo e o *priming* em sementes (Ahmad *et al.*, 2015).

Aplicação de *Se*, via *spray* foliar, promoveu tolerância à seca em *Brassica napus*, atenuando os efeitos da deficiência hídrica na massa seca total, no índice de área foliar e taxa de crescimento relativo (Valadabadi *et al.*, 2010). Entretanto, a ausência de alterações, em presença de *Se* para os parâmetros aqui analisados de AF, TCR-h, AFT, AFE e MS (Figura 4), sugere que os resultados obtidos sejam decorrentes, possivelmente, de um tratamento precoce e análises subsequentes tardias. De fato, o *priming* em sementes com *Se* mostrou-se efetivo na tolerância a estresses abióticos em plântulas (Hasanuzzaman and Fujita, 2011; Nawaz *et al.*, 2013; Yao *et al.*, 2013; Diao *et al.*, 2014). Em consonância com esses resultados observou-se também que a aplicação de *Se* via *spray* foliar apresentou aumento no TRA em oliveira (*Olea europea*) em condições de deficiência hídrica (Proietti *et al.*, 2013). Os resultados aqui

obtidos revelam, no entanto, que o *Se* não alterou o TRA foliar em tomate sob deficiência hídrica, mesmo entre aquelas plantas tratadas com 250 μ M de selenato (Figura 3), as quais apresentaram menores sintomas de murcha (Figura 1) e demoraram maior período de tempo para atingir o Ψ_w de -1,5 MPa (Figura 2). O *Se* aumentou a tolerância à seca através da manutenção da pressão de turgor e dos parâmetros de trocas gasosas em plântulas de trigo (*Triticum spp.*) (Nawaz *et al.*, 2013), eficiência do uso da água em milho (*Zea mays*) (Sajedi *et al.*, 2009) e aumento na condutância estomática e na eficiência fotoquímica do fotossistema II também em trigo (Tadina *et al.*, 2007). No entanto, os resultados aqui obtidos demonstram que a melhoria no *status* hídrico observado em plantas cujas sementes foram tratadas com 250 μ M de selenato parecem não estar associados a parâmetros de fluorescência e trocas gasosas em presença de *Se*. Todavia, é importante mencionar que, mesmo sem diferenças estatísticas, houve uma tendência de aumento da eficiência do uso intrínseco da água (EUAi) em plantas tratadas com *priming* com 250 μ M de selenato sob estresse por deficiência hídrica (Figura 6F).

Recentemente, uma extensiva modulação metabólica, específica para a presença de *Se*, foi demonstrada em *A. thaliana* (Ribeiro *et al.*, 2016). Considerando as pequenas alterações aqui observadas nos compostos associados ao metabolismo do carbono (Figura 9), da mesma forma que descrito anteriormente (vide capítulo I), é plausível sugerir que tanto a assimilação quanto o metabolismo do carbono são possivelmente ajustados em presença de *Se*, bem como em condições de restrição hídrica. Assim, plantas tratadas aqui com altas doses de selenato (250 μ M), ao apresentarem aumento nos níveis de fumarato e concomitante redução do crescimento (vide capítulo I), evidenciam um possível reajuste no fluxo metabólico envolvendo a conversão de fumarato a 2-oxoglutarato. Nesse caso, o reajuste seria necessário para tolerância ao estresse decorrente da exposição altas dosagens de *Se*. Por outro lado, plantas tratadas com altas dosagens de selenato (250 μ M) em condições de deficiência hídrica tiveram o conteúdo de fumarato ainda mais elevado (Figura 9F). Tomados em conjunto, esse resultado aliado a atuação do fumarato como fonte alternativa de carbono similar ao amido (Tschoep *et al.*, 2009; Pracharoenwattana *et al.*, 2010; Xue *et al.*, 2010) bem como ao combate a espécies reativas de oxigênio em *Pseudomonas fluorescens* (Thomas *et al.*, 2016) e a estresses vários (revisado por Araújo *et al.*, 2012), indicam que o fumarato possa representar, possivelmente, um mecanismo envolvido na tolerância ao déficit hídrico em plantas de tomate tratadas com *Se*.

Inúmeros estudos atribuem melhorias no metabolismo oxidativo ao *Se per se* (Hartikainen *et al.*, 2001; Xue *et al.*, 2001). Os resultados aqui obtidos indicam, contudo, apenas tendências de aumento na atividade da CAT em resposta à suplementação com altas concentrações de selenato de sódio (250µM) sob deficiência hídrica (Figura 11 A). Assim, embora apenas parcialmente, os resultados aqui obtidos estão em consonância com outros estudos que investigaram o efeito do *Se* no metabolismo oxidativo em plantas sob condições de estresse (Simova-Stoilova *et al.*, 2010; Yao *et al.*, 2011; Proietti *et al.*, 2013). Registre-se que a atividade da APX permaneceu inalterada em presença de *Se* e de estresse hídrico (Figura 11 B). Cabe mencionar que a atividade da APX diminuiu em plântulas de arroz submetidas a estresse severo por seca (Sharma e Dubey, 2005) e que, recentemente, foi demonstrado que a perda funcional da APX citosólica parece ser importante para a tolerância a altos níveis de *Se* (Jiang *et al.*, 2016), sugerindo que a relação entre a atividade APX e o *Se*, apresenta-se como potencial explanação para melhor se compreender o metabolismo do *Se* em plantas.

Saliente-se que o ajuste osmótico é um importante mecanismo de defesa a estresses vários agindo, assim, na proteção a enzimas e membranas biológicas. Tal mecanismo é grandemente facilitado pelo acúmulo de solutos produzidos em altas concentrações em plantas submetidas a condições de estresse (Ahmad *et al.*, 2015). Dentre esses solutos a prolina apresenta papel de destaque, particularmente ao se considerar que a mesma é acumulada em plantas de tomate em condições de estresse (Park *et al.*, 2004). Dentro desse contexto, o *Se* promoveu aumentos no conteúdo de prolina em trigo (*Triticum sp*) em condições de restrição hídrica (Kuznetsov *et al.*, 2003). Contudo, apesar de as plantas sob deficiência hídrica aqui analisadas apresentarem um grande acúmulo de prolina em suas folhas ao final da limitação hídrica, este resultado não é consequência do *priming* em sementes com *Se* (Figura 11).

Tomados em conjunto, os resultados aqui obtidos associados às informações discutidas acima indicam que os impactos do *Se* no crescimento e na tolerância de plantas a estresses abióticos está associada não somente a sua concentração, como discutido anteriormente (vide capítulo I), mas também à sua forma de aplicação. Ao considerar-se, pois, esses pontos é plausível sugerir que um transportador de alta afinidade com o *Se* esteja possivelmente presente nas folhas, tornando a aplicação foliar via *spray* uma adequada alternativa para suprir as plantas com este microelemento (Prauchner, 2014). Cumpre mencionar também que a idade das plantas em que as

análises biométricas, bioquímicas e enzimáticas são realizadas parece, de certo modo, estar associada à assimilação do *Se* e ao seu papel na tolerância ao estresse (Nawaz *et al*, 2013; Diao *et al*, 2014). Assim, em sorgo (*Sorghum bicolor*) os efeitos do *Se* no aumento da atividade das enzimas antioxidativas e na redução na taxa de formação de EROs foram mais evidentes em condições de estresse do que em condições ótimas (Djanaguiraman *et al*, 2010), mostrando, assim, que a ação do *Se* também depende das condições ambientais e fisiológicas em que as plantas se encontram. Coletivamente essas informações sugerem que a importância do *Se* seja maior em condições de estresse e em plântulas quando aplicados via *priming*.

Tendo em vista a existência de vários fatores limitantes à assimilação e ao metabolismo do *Se* nas plantas, recomenda-se aqui que outros estudos e adequações metodológicas sejam realizados com o intuito de se elucidar o papel do *Se* no metabolismo primário e tolerância à deficiência hídrica em tomate. Registre-se aqui que a modulação metabólica com envolvendo a conversão de fumarato a 2-oxoglutarato em presença de *Se* com o consequente aumento do conteúdo de fumarato sob condições de limitação hídrica, aliada a manutenção do Ψ_w em níveis não críticos durante um maior período demonstram que o *Se* possa conferir certa tolerância ao déficit hídrico. Cabe mencionar que os mecanismos envolvidos nessa resposta são ainda sobremodo desconhecidos e ao que tudo indica dependente não somente da espécie e da forma de aplicação mas também da dose aplicada e do momento no qual as análises são pois efetuadas. Assim, essa possível tolerância só poderá ser mais bem evidenciada em experimentos utilizando técnicas outras que não o *priming* em sementes e/ou análises e medições feitas em plantas ao longo do seu desenvolvimento. Portanto, é plausível sugerir que somente estudos envolvendo diferentes formas de aplicação, períodos e dosagens aliados à adequações metodológicas poderão, enfim, elucidar o papel do *Se* em resposta à deficiência hídrica.

5. CONCLUSÃO

A presença de *Se* promoveu uma sutil tendência de maiores tolerâncias à deficiência hídrica severa, evidenciado pelos menos aparentes sintomas de murcha e pela manutenção do Ψ_w a níveis não críticos por mais tempo em plantas cujas sementes foram tratadas com altas doses de *Se*. Tais alterações, no entanto, não estão associadas a alterações fotossintéticas, fotoquímicas, ou do sistema antioxidativo apesar de uma maior eficiência do uso intrínseco da água. No entanto, um reajuste metabólico

observado aqui por aumentos significativos no conteúdo de fumarato pode representar um mecanismo de tolerância à restrição hídrica em plantas tratadas com *Se*. Adicionalmente, a despeito da ausência de alterações no crescimento aqui observadas é preciso manter em mente que a observação dos possíveis efeitos do *Se* ocorre grandemente em função da forma de aplicação e idade das plantas analisadas. Assim, uma pormenorizada investigação envolvendo outras formas de aplicação e um acompanhamento periódico das plantas suplementadas com *Se* traduzir-se-á em um provável melhor entendimento acerca dos efeitos do *Se* em plantas de tomate sob déficit hídrico. Em conjunto, as informações aqui obtidas podem auxiliar na compreensão dos mecanismos fisiológicos e metabólicos associados ao *Se* em plantas de tomateiro sob estresse hídrico severo.

6. CONCLUSÕES GERAIS

A presença de *Se* culminou com uma tendência a maiores crescimento e ganho em biomassa em plantas submetidas a baixas concentrações (25 μ M) deste elemento, ao passo que efeito contrário é observado em plantas submetidas a concentrações elevadas (250 μ M). Quando estas plantas eram submetidas às condições de deficiência hídrica severa, aquelas cujas sementes foram tratadas com altas doses de *Se* (250 μ M) apresentaram sintomas menos aparentes de murcha e pela manutenção do Ψ_w a níveis não-críticos por mais tempo, evidenciando um provável comportamento de tolerância ao déficit hídrico. Análises fisiológicas mostraram que estas alterações não estão associadas a alterações em parâmetros relacionados à fotossíntese nem à fluorescência da clorofila *a* em condições normais, assim como não foram observadas alterações do sistema antioxidativo, apesar de se verificar uma maior eficiência do uso intrínseco da água. No entanto, um ajuste metabólico observado por aumentos significativos no conteúdo de fumarato, tanto em condições normais quanto em condições de deficiência hídrica, pode representar um mecanismo facilitador do crescimento, em condições normais, ao considerar-se que estes ocorreram acoplados à diminuição dos níveis de proteína e aminoácidos em plantas cultivadas com 25 μ M de selenato, bem como um mecanismo de tolerância à restrição hídrica em plantas tratadas com *Se*.

Ainda em relação às alterações no crescimento, em condições normais, foram encontradas evidências, embora circunstanciais e limitadas, que quando comparadas a outros trabalhos relatados na literatura, como os baixos níveis de proteínas aqui

relatados, pode indicar não somente um reajuste metabólico, mas também à degradação específica de selenoproteínas via ubiquitinação, bem como o acúmulo de amido não afetado em presença de *Se*, o que sugere que uma pormenorizada investigação envolvendo o metabolismo primário em geral e, em particular, do amido irá, se faz necessária, para um melhor entendimento acerca da captação e assimilação do carbono em plantas de tomate tratadas com *Se*. Adicionalmente, a despeito da ausência de alterações no crescimento aqui observadas, em condições de déficit hídrico, é preciso ressaltar que a observação dos possíveis efeitos do *Se* ocorre grandemente em função da forma de aplicação e idade das plantas analisadas. Dessa forma, além da investigação de outras formas de aplicação deste elemento, deve ser considerada a necessidade de um acompanhamento periódico das plantas suplementadas com *Se*. Em conjunto, as informações aqui obtidas auxiliam na compreensão dos mecanismos fisiológicos e metabólicos associados ao *Se* em plantas de tomateiro, tanto em condições normais, quanto em condições de déficit hídrico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad R, Waraich EA, Nawaz F, Ashraf MY, Khalid M** (2015) Selenium (Se) improves drought tolerance in crop plants– a myth or fact?. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **96**: 372-380
- Araújo W L, Tohge T, Osorio S, Lohse M, Balbo I, Krahnert I, Fernie, A. R.** (2012). Antisense inhibition of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex in tomato demonstrates its importance for plant respiration and during leaf senescence and fruit maturation. *The Plant Cell* **24**: 2328-2351
- Aslam M, Harbit K B, Huffaker RC** (1990). Comparative effects of selenite and selenate on nitrate assimilation in barley seedlings. *Plant, Cell and Environment*, **13**: 773-782.
- Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D.** (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, **39**: 205-207
- Bittman S, Buckley WT, Zaychuk K, Brown EAP** (2000). U.S. Patent No. 6,058,649. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office
- Brown TA, Shrift, A.** (1982). Selenium: toxicity and tolerance in higher plants. *Biological Reviews*, **57**: 59-84
- Cakmak I, Horst WJ** (1991) Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum* **83**: 463–468
- Cairo PAR** (1995) Curso básico de relações hídricas de plantas. UESB, Vitória da Conquista
- Chai Q, Gan Y, Zhao C, Xu HL, Waskom RM, Niu Y, Siddique KHM** (2016) Regulated deficit irrigation for crop production under drought stress. A review. *Agronomica for Sustainable Development* **36**: 1–21
- Chen CC, Sung JM** (2001) Priming bitter gourd seeds with selenium solution enhances germinability and antioxidative responses under sub-optimal temperature. *Physiologia Plantarum* **111**: 9–16
- Chu J, Yao X, Zhang Z** (2010) Responses of wheat seedlings to exogenous selenium supply under cold stress. *Biological Trace Elements Research* **136**: 355–363
- Çolak G, Baykul CG, Catak E, Caner N,** (2014). The effects of selenium on *Lycopersicon esculentum* Mill. seedlings. *Pakistan Journal of Botany*, **46**: 911-920.
- DaMatta FM, Rena AB** (2002) Ecofisiologia de cafezais sombreados e a pleno sol. In L Zambolim, ed, *O Estado da Arte de Tecnologias na Produção de Café*, UFV, Viçosa, pp. 93-135

- Diao M, Ma L, Wang J** (2014) Selenium Promotes the Growth and Photosynthesis of Tomato Seedlings Under Salt Stress by Enhancing Chloroplast Antioxidant Defense System. *Journal of Plant Growth Regulation*, **33**: 671–682
- Dimkovikj A, Fisher B, Hutchison K, Hoewyk D Van** (2015) Stuck between a ROS and a hard place : Analysis of the ubiquitin proteasome pathway in selenocysteine treated *Brassica napus* reveals different toxicities during selenium assimilation. *Journal of Plant Physiology* **181**: 50–54
- Dimkovikj A, Hoewyk D Van** (2014) Selenite activates the alternative oxidase pathway and alters primary metabolism in *Brassica napus* roots : evidence of a mitochondrial stress response. *BMC Plant Biology* **14**: 1–15
- Diwadkar-Navsariwala V, Prins GS, Swanson SM, Birch L a, Ray VH, Hedayat S, Lantvit DL, Diamond AM** (2006) Selenoprotein deficiency accelerates prostate carcinogenesis in a transgenic model. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 8179–8184
- Djanaguiraman M, Devi DD, Shanker AK, Sheeba JA, Bangarusamy U** (2004) Impact of selenium spray on monocarpic senescence of soybean (*Glycine max* L .) Food and Agriculture Organization of the United Nations. **2**: 44–47
- Djanaguiraman M, Prasad PVV, Seppanen M** (2010) Selenium protects sorghum leaves from oxidative damage under high temperature stress by enhancing antioxidant defense system. *Plant Physiology Biochemistry* **48**: 999–1007
- Eustice DC, Kull FJ, Shrift A.** (1981). Selenium toxicity: aminoacylation and peptide bond formation with selenomethionine. *Plant Physiology*, **67**: 1054-1058
- Fairweather-Tait SJ, Bao Y, Broadley MR, Collings R, Ford D, Hesketh,JE, Hurst R.** (2011). Selenium in human health and disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, **14**: 1337-1383
- 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**: 250-263
- Filek M, Keskinen R, Hartikainen H, Szarejko I, Janiak A, Miszalski Z, Golda A** (2008). The protective role of selenium in rape seedlings subjected to cadmium stress. *Journal of Plant Physiology*, **165**: 833-844
- Flohe L, Günzler W a, Schock HH** (1973) Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *Federation of European Biochemical Societies* **32**: 132–134

- Fu LH, Wang XF, Eyal Y, She YM, Donald LJ, Standing KG, Ben-Hayyim, G.** (2002). A selenoprotein in the plant kingdom mass spectrometry confirms that an opal codon (UGA) encodes selenocysteine in *Chlamydomonas reinhardtii* glutathione peroxidase. *Journal of Biological Chemistry*, **277**: 25983-25991
- Germ M, Stibilj V, Kreft I** (2007) Metabolic importance of selenium for plants. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology* **1**: 91–97
- Gibon Y, Blaesing OE, Hannemann J, Carillo P, Ho M, Palacios N, Cross J, Selbig J, Stitt M** (2004) A Robot-Based Platform to Measure Multiple Enzyme Activities in *Arabidopsis* Using a Set of Cycling Assays: Comparison of Changes of Enzyme Activities and Transcript Levels during Diurnal Cycles and in Prolonged Darkness. *The Plant Cell*. **16**: 3304–3325
- Gleick PH, Palaniappan M** (2010) Peak water limits to freshwater withdrawal and use. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**: 11155–62
- Ghoraba WF, Mohsen AA** (2015). Role of Selenium on *Vicia faba* Seedlings Subjected to Mercury and Cadmium Stress. *Integrated Journal of British*, **2**:16-44.
- Ghosh P, Roy SS, Chakraborty P, Ghosh S, Bhattacharya S** (2013) Effects of organoselenium compound 2-(5-selenocyanatopentyl)- benzo[de]isoquinoline 1,3-dione on cisplatin induced nephrotoxicity and genotoxicity: An investigation of the influence of the influence of the compound on oxidative stress and antioxidant enzyme system. *Biometals*, **26** : 61-73
- Govasmark E, Salbu B** (2011) Translocation and re-translocation of selenium taken up from nutrient solution during vegetative growth in spring wheat. *Journal of Science theFood and Agriculture* **91**: 1367–1372
- Hamilton SJ** (2004) Review of selenium toxicity in the aquatic food chain. *Science Total and Environmental* **326**: 1–31
- Hansen D, Duda PJ, Zayed A, Terry N.** (1998). Selenium removal by constructed wetlands: role of biological volatilization. *Environmental Science and Technology*, **32**: 591-597
- Hanson B, Garifullina GF, Lindblom SD, Wangeline A, Ackley A, Norton AP, Lawrence CB, Pilon-smits EAH** (2003) Selenium accumulation protects *Brassica juncea* from invertebrate herbivory and fungal infection. *New Phytologist* **159**: 461-469
- Hartikainen H, Pietola L, Simojoki A** (2001) Quantification of fine root responses to selenium toxicity. *Agricultural Food Science*, **10**: 53–58
- Hartikainen H, Xue T, Piironen V** (2000). Selenium as an anti-oxidant and pro-oxidant in ryegrass. *Plant and Soil*, **225**:193-200.

- Hasanuzzaman M, Fujita M** (2011) Selenium pretreatment upregulates the antioxidant defense and methylglyoxal detoxification system and confers enhanced tolerance to drought stress in rapeseed seedlings. *Biological Trace Element Research* **143**: 1758–1776
- Hawrylak-nowak B, Matraszek R** (2010) Selenium Modifies the Effect of Short-Term Chilling Stress on Cucumber Plants. *Biological Trace Element Research* **138**: 307–315
- Jiang L, Chen Z, Gao Q, Ci L, Cao S, Han Y** (2016) Loss-of-function mutations in the APX1 gene result in enhanced selenium tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment*. **39**: 2133–2144
- Jisha KC, Vijayakumari K, Puthur JT** (2013) Seed priming for abiotic stress tolerance: An overview. *Acta Physiology Plantarum* **35**: 1381–1396
- Kabata-Pendias A, Pendias H** (2001). Trace elements in plants. *Trace Element in Soils and Plants*, 73-98
- Küppers M, O'Rourke L, Bockelée-Morvan D, Zakharov V, Lee S, von Allmen P, Carry B, Teyssier D, Marston A, Müller T, et al** (2014) Localized sources of water vapour on the dwarf planet (1) Ceres. *Nature* **505**: 525–527
- Kuznetsov V V, Kholodova VP, Kuznetsov V V, Yagodin B** (2003) Selenium regulates the water status of plants exposed to drought. *Biological Sciences* **390**: 266–268
- Lehotai N, Lyubenova L** (2016) Nitro-oxidative stress contributes to selenite toxicity in pea (*Pisum sativum* L). *Plant and Soil*, **400**:107–122
- Lemire J, Mailloux R, Auger C, Whalen D, Appanna VD** (2010) Minireview *Pseudomonas fluorescens* orchestrates a fine metabolic-balancing act to counter aluminium toxicity. *Environmental microbiology*, **12**: 1384–1390
- Li D, Cheng Y, Wu C, Li W, Li N, Yang Z** (2014) Selenite reduction by *Shewanella oneidensis* MR-1 is mediated by fumarate reductase in periplasm. *Scientific Reports*, **4**:1–7.
- Lin ZQ, Terry N** (2003) Selenium removal by constructed wetlands: Quantitative importance of biological volatilization in the treatment of selenium-laden agricultural drainage water. *Environmental Science and Technology* **37**: 606–615
- Lobanov A V, Fomenko DE, Zhang Y, Sengupta A, Hatfield DL, Gladyshev VN** (2007) Evolutionary dynamics of eukaryotic selenoproteomes: large selenoproteomes may associate with aquatic life and small with terrestrial life. *Genome biology* **8**
- Mehdi Y, Hornick J, Istasse L, Dufrasne I** (2013) Selenium in the Environment, Metabolism and Involvement in Body Functions. *Molecules* **18**: 3292-3311

- Mielke MS, Hoffmann A, Endres L, Fachinello JC** (1995) Comparison of laboratory and field methods for the estimation of leaf area of wild fruit species. *Scientia Agricola* **52**: 82-88
- Mikkelsen RL, Page AL, Bingham FT** (1989). Factors affecting selenium accumulation by agricultural crops. *Selenium in Agriculture and the Environment*, **23** : 65-94.
- Mora ML, Durán P, Acuña AJ, Cartes P, Demanet R, Gianfreda L** (2015) Improving selenium status in plant nutrition and quality. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* **15**: 486–503
- Mozafariyan M, Kamelmanesh MM, Hawrylak-Nowak B** (2016). Ameliorative effect of selenium on tomato plants grown under salinity stress. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 1-13.
- Nancy D, Arulselvi PI.** (2014). Effect of Selenium Fortification on Biochemical Activities of Tomato (*Solanum lycopersicum*) Indo American Journal of Pharmaceutical Research ..., **4**: 3997-4005.
- Nawaz F, Ashraf MY, Ahmad R, Waraich EA** (2013) Selenium (Se) seed priming induced growth and biochemical changes in wheat under water deficit conditions. *Biological Trace Elements Research* **151**: 284–293
- Novoselov S V, Rao M, Onoshko N V, Zhi H, Kryukov G V, Xiang Y, Weeks DP, Hat DL, Gladyshev VN** (2002) Selenoproteins and selenocysteine insertion system in the model plant cell system , *Chlamydomonas reinhardtii*. *The EMBO Journal* **21**: 3681–3693
- Nunes-nesi A, Carrari F, Gibon Y, Sulpice R, Lytovchenko A, Fisahn J, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ, Fernie AR** (2007) Deficiency of mitochondrial fumarase activity in tomato plants impairs photosynthesis via an effect on stomatal function. *The Plant Journal* **50**:1093–1106
- 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. *Journal Hazard Mater* **287**: 384–391
- Paparella S, Araújo SS, Rossi G, Wijayasinghe M, Carbonera D, Balestrazzi A** (2015) Seed priming: state of the art and new perspectives. *Plant Cell Reports* **34**: 1281–1293
- Park EJ, Jeknić Z, Sakamoto A, DeNoma J, Yuwansiri R, Murata N, Chen TH** (2004). Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in tomato protects seeds, plants, and flowers from chilling damage. *The Plant Journal*, **40**: 474-487

- Pedrero Z, Madrid Y, Hartikainen H, Cámara C** (2007). Protective effect of selenium in broccoli (*Brassica oleracea*) plants subjected to cadmium exposure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**: 266-271.
- Pennanen A, xue T, hartikainen H** (2002) Protective role of selenium in plant subjected to severe UV irradiation stress. *Journal of Applied Botany and Food Quality* **76**: 66–76
- Pittarello M.** (2011). Evaluation of phytoremediation potential and physiological response to accumulation of several metals and metalloids by *Salix spp.*, *Brassica juncea*, *Phragmites australis* e *Populus trichocarpa*. Università degli Studi di Padova. Tese. 49-93.
- Poorter H, Evans JR.** (1998). Photosynthetic nitrogen-use efficiency of species that differ inherently in specific leaf area. *Oecologia*, **116**: 26-37
- Poorter H, Bergkotte M** (1992) Chemical composition of 24 wild species differing in relative growth rate. *Plant Cell and Environment* **15**: 221–229
- Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE** (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *BBA - Bioenergetics* **975**: 384–394
- Pracharoenwattana I, Zhou W, Keech O, Francisco PB, Udomchalothorn T, Tschoep H, Stitt M, Gibon Y, Smith SM** (2010) Arabidopsis has a cytosolic fumarase required for the massive allocation of photosynthate into fumaric acid and for rapid plant growth on high nitrogen. *The Plant Journal* **62**: 785–795
- Prauchner CA** (ed) (2014) A importância do Selênio para a Agropecuária e Saúde Humana. Editora UFSM, Santa Maria- RS
- Proietti P, Nasini L, Del Buono D, D'Amato R, Tedeschini E, Businelli D** (2013) Selenium protects olive (*Olea europaea* L.) from drought stress. *Scientia Horticulturae* **164**: 165–171
- Pukacka S, Ratajczak E, Kalembe E** (2011) The protective role of selenium in recalcitrant *Acer saccharum* L. seeds subjected to desiccation. *Journal of Plant Physiology* **168**: 220–225
- Qing X, Zhao X, Hu C, Wang P, Zhang Y** (2015) Ecotoxicology and Environmental Safety Selenium alleviates chromium toxicity by preventing oxidative stress in cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *Pekinensis*) leaves. *Ecotoxicol Environmental* **114**: 179–189
- Qing X, Zhao X, Hu C, Wang P, Zhang Y** (2015) Ecotoxicology and Environmental Safety Selenium alleviates chromium toxicity by preventing oxidative stress in cabbage (

Brassica campestris L . ssp . *Pekinensis*) leaves. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **114**: 179–189

Rayman MP (2008) Food-chain selenium and human health : emphasis on intake *British Journal of Nutrition*. **100**: 254–268

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

Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG (1973) Selenium: Biochemical Role as a Component of Glutathione Peroxidase. *Science* **179**: 588–590

Sajedi N a, Ardakani MR, Naderi a, Madani H, Boojar MMA (2009) Response of Maize to Nutrients Foliar Application Under Water Deficit Stress Conditions *Islamic Azad University , Research and Science Branch , Ahvaz , Iran Agriculture Research Center , Islamic Azad University , Karaj Branch , Iran Faculty of Agriculture*. **4**: 242–248

Saradadevi R, Bramley H, Siddique KHM, Edwards E, Palta JA (2014) Reprint of Contrasting stomatal regulation and leaf ABA concentrations in wheat genotypes when split root systems were exposed to terminal drought. *Field Crops Research* **165**: 5–14

Scholander PF, Hammel HT, Hemmingsen EA, Bradstreet ED (1964) Hydrostatic pressure and osmotic potentials in leaves of mangroves and some other plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **52**: 119-125

Simova-Stoilova L, Vaseva I, Grigorova B, Demirevska K, Feller U (2010) Proteolytic activity and cysteine protease expression in wheat leaves under severe soil drought and recovery. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**: 200–206

Sharma P, Dubey RS (2005) Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Growth Regulation* **46**: 209–221

Silva, F. D., & Azevedo, C. D. (2002). Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, **4**: 71-78.

Sors TG, Ellis DR, Salt DE (2005) Selenium uptake , translocation , assimilation and metabolic fate in plants. *Photosynthesis Research*, **86**: 373–389

Stadtman TC (1996). Selenocysteine. *Annual Review of Biochemistry*, **65**: 83-100

Sweetlove LJ, Beard KFM, Nunes-nesi A, Fernie AR, Ratcliffe RG (2010) Not just a circle : flux modes in the plant TCA cycle. *Trends Plant Science* **15**: 462–470.

- Tadina N, Germ M, Kreft I, Breznik B** (2007) Effects of water deficit and selenium on common buckwheat plants (*Fagopyrum esculentum* Moench.). *Photosynthetica* **45**: 472–476
- Thomas SC, Alhasawi A, Auger C, Omri A, Appanna VD** (2016) The role of formate in combatting oxidative stress. *Antonie Van Leeuwenhoek* **109**: 263–271
- Tschoep H, Gibon Y, Carillo P, Armengaud P, Szecowka M, Nunes-Nesi A, Fernie AR, Koehl K, Stitt M** (2009) Adjustment of growth and central metabolism to a mild but sustained nitrogen-limitation in *Arabidopsis*. *Plant, Cell and Environment* **32**: 300–318
- Valadabadi SA, Shiranirad AH, Farahani HA** (2010) Ecophysiological influences of zeolite and selenium on water deficit stress tolerance in different rapeseed cultivars. *Journal of Ecology and Natural Environment* **2**: 154–159
- Van Huysen T, Abdel-Ghany S, Hale KL, LeDuc D, Terry N, Pilon-Smits EAH** (2003) Overexpression of cystathionine-γ-synthase enhances selenium volatilization in *Brassica juncea*. *Planta* **218**: 71–78
- Waraich EA, Ahmad R, Ashraf MY, Saifullah, Ahmad M** (2011) Improving agricultural water use efficiency by nutrient management in crop plants. *Acta Agric Scand Sect B- Soil Plant Science* **61**: 291–304
- Watts DL, Ph D** (1817) The Nutritional Relationships of Selenium. *Journal of Orthomolecular Medicine* **9**:111–117
- White PJ** (2015) Selenium accumulation by plants. *Annals of Botany*. **118** :1-19
- White PJ, Brown PH** (2010) Plant nutrition for sustainable development and global health. *Annals of Botany* **105**: 1073–1080
- Xue T, Hartikainen H, Piironen V** (2001) Antioxidative and growth-promoting effect of selenium on senescing lettuce. *Plant and Soil*, **237**: 55–61
- Xue X, Li W, Li Z, Xia Y, Ye Q** (2010) Enhanced 1,3-propanediol production by supply of organic acids and repeated fed-batch culture. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **37**: 681–687
- Yao X, Chu J, Wang G** (2009) Effects of Selenium on Wheat Seedlings Under Drought Stress. *Biological Trace Element Research*, **130**: 283–290
- Yao X, Chu J, He X, Ba C** (2011) Protective role of selenium in wheat seedlings subjected to enhanced UV-B radiation. *Russ Journal of Plant Physiology* **58**: 283–289
- Yao X, Jianzhou C, Xueli H, Binbin L, Jingmin L, Zhaowei Y** (2013) Effects of selenium on agronomical characters of winter wheat exposed to enhanced ultraviolet-B. *Ecotoxicol and Environmental Safety* **92**: 320–326

- Yeh YM, Chiu KY, Chen CL, Sung JM** (2005) Partial vacuum extends the longevity of primed bitter melon seeds by enhancing their anti-oxidative activities during storage. *Scientia Horticulturae* **104**: 101–112
- Yuan L, Yin X, Li M** (2015) Biofortification and phytoremediation of selenium in China. *Frontiers in Plant Science* **6**: 1–8
- Zhang Y, Gladyshev VN** (2011). Comparative genomics of trace element dependence in biology. *Journal of Biological Chemistry*, **286**: 23623-23629.
- Zhao FJ, Lopez-Bellido FJ, Gray CW, Whalley WR, Clark LJ, McGrath SP** (2007) Effects of soil compaction and irrigation on the concentrations of selenium and arsenic in wheat grains. *Science Total Environmental* **372**: 433–439
- Zheng M, Tao Y, Hussain S, Jiang Q, Peng S** (2015) Seed priming in dry direct-seeded rice : consequences for emergence , seedling growth and associated metabolic events under drought stress. *Plant Growth Regulation* **78**: 167–178
- Zhu Y, Pilon-smits EAH, Zhao F, Williams PN, Meharg AA** (2009) Selenium in higher plants : understanding mechanisms for biofortification and phytoremediation. *Trends in Plant Science*, **14**:436-442.
- Zhu YL** (1999) Cadmium Tolerance and Accumulation in Indian Mustard Is Enhanced by Overexpressing gamma -Glutamylcysteine Synthetase. *Plant Physiology* **121**: 1169–1177