

LUBIA DA SILVA TEIXEIRA

**AÇÃO DO SELÊNIO NO CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS
DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) EM RESPOSTA À DISPONIBILIDADE DE ZINCO E
NITRATO: PAPEL DAS CITOCININAS**

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

Orientador: Dimas Mendes Ribeiro

Coorientadora: Genaina Aparecida de Souza

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2024

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

T266a
2024
Teixeira, Lubia da Silva, 1995-
Ação do selênio no crescimento e desenvolvimento de
plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) em resposta à disponibilidade
de zinco e nitrato: papel das citocininas / Lubia da Silva
Teixeira. – Viçosa, MG, 2024.
1 tese eletrônica (113 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Dimas Mendes Ribeiro.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Biologia Vegetal, 2024.
Referências bibliográficas: f.20-24.
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.302>
Modo de acesso: World Wide Web.

1. Arroz - Crescimento - Efeito do selênio. 2. Selenito de
sódio. 3. Benziladenina. 4. Arroz - Nutrição. I. Ribeiro, Dimas
Mendes, 1977-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Vegetal. Doutorado em Fisiologia
Vegetal. III. Título.

CDD 22. ed. 633.188911

LUBIA DA SILVA TEIXEIRA

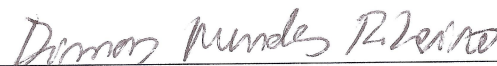
**AÇÃO DO SELÊNIO NO CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DE PLANTAS
DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) EM RESPOSTA À DISPONIBILIDADE DE ZINCO E
NITRATO: PAPEL DAS CITOCININAS**

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

APROVADA: 26 de junho de 2024.



Lubia da Silva Teixeira
Autora



Dimas Mendes Ribeiro
Orientador

AGRADECIMENTOS

À Deus, por todas as bênçãos, paz, saúde e proteção concedidas, além de guiar e iluminar meus caminhos durante minha jornada.

Ao meu pai Ubiraci por toda dedicação, carinho e apoio.

Ao meu orientador Prof. Dimas Mendes Ribeiro, pela oportunidade, por toda orientação, paciência, ajuda, incentivo e puxões de orelha, pelo conhecimento transmitido e pela grande contribuição em minha vida acadêmica.

À minha coorientadora Genaina por toda ajuda, parceria e amizade.

À Universidade Federal de Viçosa e a todos os professores que contribuíram para a minha formação.

Aos meus amigos do Laboratório de Crescimento e Desenvolvimento de Plantas Carla, Thaline, Johana, Thiago, Anny, Victor e Janaína pelo apoio, ajuda, incentivo, parceria e por todas as boas memórias.

Aos meus amigos da pós graduação e a todos os outros.

A todos aqueles que contribuíram para realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

TEIXEIRA, Lúbia da Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2024. **Ação do selênio no crescimento e desenvolvimento de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) em resposta à disponibilidade de zinco e nitrato: Papel das citocininas.** Orientador: Dimas Mendes Ribeiro. Coorientadora: Genaina Aparecida de Souza.

Os hormônios vegetais modulam os processos de absorção e utilização de nutrientes, ao passo que os nutrientes podem modificar a biossíntese e a homeostase hormonal em plantas. Assim, plantas de arroz podem ajustar seu crescimento e desenvolvimento às variações nos níveis de selênio (Se), zinco (Zn) e nitrato no ambiente. Neste contexto, os objetivos deste estudo foram avaliar os efeitos do Zn e do Se no metabolismo das citocininas em plantas de arroz, bem como investigar os impactos do Se e do Zn sobre o rendimento e qualidade nutricional dos grãos (Capítulo 1). Além disso, foi avaliado como o Se e o nitrato coagem para modificar a biossíntese das citocininas e regular o crescimento da parte aérea e das raízes de plântulas de arroz (Capítulo 2). Investigou-se, também, os efeitos do Se e da aplicação de citocinina em plantas de arroz no rendimento e na qualidade nutricional dos grãos (Capítulo 3). Os resultados do presente estudo mostraram que a elevação nos níveis de citocinina, mediada pelo fornecimento de Zn, reduziu a biomassa de raízes. Entretanto, o Se foi capaz de recuperar parcialmente a produção de biomassa de raízes nas plantas fertilizadas com Zn via redução nos níveis de citocininas na raiz. Interessantemente, o Se aumentou a concentração de citocininas nas panículas das plantas tratadas com Zn incrementando a produção de grãos. Além disso, a concentração de Se nos grãos de arroz foi positivamente associada ao fornecimento de Zn às plantas. A suplementação das plantas com Se aumentou as concentrações de proteínas nos grãos em resposta a disponibilidade de Zn. Por outro lado, as concentrações de N, S, Mg, Ca, Fe e Cu nos grãos de arroz aumentaram independente do fornecimento de Zn. De maneira geral, os resultados revelaram que o Se e o Zn atuam de forma sinérgica para melhorar o rendimento e a composição nutricional de grãos de arroz. A aplicação de Se em plântulas tratadas com 0,05 mM nitrato levou ao acúmulo de açúcar na parte aérea e na raiz e aumentou as concentrações de citocinina na raiz, enquanto diminuiu as concentrações de citocinina na parte aérea. Isto resultou na diminuição do crescimento da parte aérea e da raiz. Por outro lado, o Se combinado com 5,0 mM de nitrato não afetou a concentração de açúcar nos tecidos e regulou negativamente a biossíntese de citocininas na parte aérea e nas raízes das plântulas de arroz. Essa redução nas concentrações de citocininas mediada pelo Se diminuiu o crescimento da parte aérea, mas aumentou o crescimento das raízes. Assim, muitos dos efeitos do Se no crescimento da parte

aérea e das raízes são devidos a uma mudança no status de nitrato das plântulas. A aplicação de citocininas nas plantas de arroz melhorou as características agronômicas e o rendimento de grãos, independentemente da fertilização com Se. A citocinina estimulou a fotossíntese líquida das plantas de arroz, melhorando sua capacidade de produzir fotoassimilados para sustentar o desenvolvimento dos grãos. A redução da biomassa radicular mediada pela citocinina não foi revertida pela fertilização com Se, impactando negativamente a capacidade de absorção de minerais pelas raízes e o acúmulo de micronutrientes nos grãos. No entanto, a absorção e o acúmulo de Se nos grãos de arroz permaneceram inalterados. Além disso, a citocinina modificou a composição das proteínas de reserva, aumentando as concentrações de proteínas totais nos grãos, independentemente da fertilização com Se. Este estudo abre novas perspectivas para pesquisas futuras sobre o papel das citocininas e do Se no desenvolvimento e na qualidade dos grãos de arroz.

Palavras-chave: Selenito de sódio; Selenato de sódio; Benziladenina; Nutrientes.

ABSTRACT

TEIXEIRA, Lúbia da Silva, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2024. **Action of selenium on the growth and development of rice plants (*Oryza sativa* L.) in response to zinc and nitrate availability: Role of cytokinins.** Adviser: Dimas Mendes Ribeiro. Co-adviser: Genaina Aparecida de Souza.

Plant hormones modulate nutrient absorption and utilization processes, while nutrients can modify hormone biosynthesis and homeostasis in plants. Thus, rice plants can adjust their growth and development to variations in selenium (Se), zinc (Zn), and nitrate levels in the environment. In this context, the objectives of this study were to evaluate the effects of Zn and Se on cytokinin metabolism in rice plants, as well as to investigate the impacts of Se and Zn on grain yield and nutritional quality (Chapter 1). Additionally, it was assessed how Se and nitrate interact to modify cytokinin biosynthesis and regulate the growth of both shoot and root of rice seedlings (Chapter 2). Furthermore, the effects of Se and cytokinin application on rice plants on grain yield and nutritional quality were investigated (Chapter 3). The results of this study showed that the increase in cytokinin levels, mediated by Zn supply, reduced root biomass. However, Se was able to partially recover root biomass production in Zn-fertilized plants by reducing cytokinin levels in the root. Interestingly, Se increased cytokinin concentration in the panicles of Zn-treated plants, enhancing grain production. Moreover, Se concentration in rice grains was positively associated with Zn supply. Se supplementation increased protein concentrations in grains in response to Zn availability. On the other hand, concentrations of N, S, Mg, Ca, Fe, and Cu in rice grains increased regardless of Zn supply. Overall, the results revealed that Se and Zn act synergistically to improve rice grain yield and nutritional composition. The application of Se to seedlings treated with 0.05 mM nitrate led to sugar accumulation in both shoot and root and increased cytokinin concentrations in the root, while decreasing cytokinin concentrations in the shoot. This resulted in decreased shoot and root growth. On the other hand, Se combined with 5.0 mM nitrate did not affect sugar concentration in tissues and negatively regulated cytokinin biosynthesis in both shoot and root of rice seedlings. This Se-mediated reduction in cytokinin concentrations decreased shoot growth but increased root growth. Thus, many of the effects of Se on shoot and root growth are due to a change in the nitrate status of seedlings. The application of cytokinins in rice plants improved agronomic traits and grain yield, regardless of Se fertilization. Cytokinin stimulated net photosynthesis of rice plants, enhancing their capacity to produce assimilates to support grain development. The reduction in root biomass mediated by cytokinin was not reversed by Se

fertilization, negatively impacting mineral absorption capacity by roots and micronutrient accumulation in grains. However, Se absorption and accumulation in rice grains remained unchanged. Additionally, cytokinin modified the composition of reserve proteins, increasing total protein concentrations in grains regardless of Se fertilization. This study opens new perspectives for future research on the role of cytokinins and Se in the development and quality of rice grains.

Keywords: Sodium selenite; Sodium selenate; Benzyladenine; Nutrients.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	10
REFERÊNCIAS	16
CAPÍTULO I – EFEITOS DA APLICAÇÃO DE SELÊNIO E ZINCO NA PRODUÇÃO E QUALIDADE NUTRICIONAL DE GRÃOS DE PLANTAS DE ARROZ (<i>Oryza sativa</i> L.)	21
RESUMO	22
ABSTRACT	23
1 INTRODUÇÃO	24
2 MATERIAL E MÉTODOS	26
2.1 Material vegetal e condições de cultivo	26
2.2 Parâmetros produtivos	27
2.3 Quantificação de citocininas	27
2.4 Análise mineral	28
2.5 Análises bioquímicas	28
2.6 PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)	28
2.7 Análise estatística	29
3 RESULTADOS	29
3.1 O Se modula a biomassa e a produção de arroz em resposta à disponibilidade de Zn... ..	29
3.2 A absorção e o acúmulo de Zn e Se nos grãos de arroz está associada à disponibilidade de zinco no solo	34
3.3 O Se afeta o acúmulo de minerais e produtos de reserva nos grãos em resposta ao fornecimento de Zn	37
4 DISCUSSÃO	39
5 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	44
MATERIAL SUPLEMENTAR	52
CAPÍTULO II – A BIOSÍNTESE DE CITOCININA É AFETADA PELA DISPONIBILIDADE DE SELÊNIO E NITRATO PARA REGULAR O CRESCIMENTO DA PARTE AÉREA E RAÍZES EM PLÂNTULAS DE ARROZ	60
RESUMO	61
ABSTRACT	62
1 INTRODUÇÃO	63
2 MATERIAL E MÉTODOS	64
2.1 Condições de cultivo e delineamento experimental	64
2.2 Avaliação do Crescimento Vegetativo	65
2.3 Quantificação de nitrato, selênio e açúcares	65

2.4 Análise de citocinina	66
2.5 PCR Quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR)	66
2.6 Análise Estatística	67
3 RESULTADOS	67
4 DISCUSSÃO	73
5 CONCLUSÃO	76
REFERÊNCIAS	78
MATERIAL SUPLEMENTAR	81
CAPÍTULO III – EFEITOS DA CITOCININA E DO SELÊNIO NOS ASPECTOS FISIOLÓGICOS E DA PRODUÇÃO DE PLANTAS DE ARROZ (<i>Oryza sativa</i> L.).....	83
RESUMO	84
ABSTRACT	85
1 INTRODUÇÃO	86
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	88
2.1 Material vegetal e condições de cultivo	89
2.2 Parâmetros produtivos	89
2.3 Trocas gasosas	89
2.4 Análise mineral.....	90
2.5 Análises bioquímicas e pigmentos	90
2.6 Análise estatística	91
3 RESULTADOS	91
3.1 A citocinina modula o acúmulo de biomassa e a produção de arroz de forma independente da disponibilidade de Se	91
3.2 A aplicação de citocinina incrementa a fotossíntese líquida e modula o acúmulo de fotoassimilados em grãos inferiores de panículas de arroz no início do enchimento de grãos	96
3.3 Efeitos do Se e da citocinina na composição nutricional dos grãos maduros de arroz ..	97
3.4 A citocinina afeta a absorção e a alocação de elementos minerais para as sementes independentemente da disponibilidade de selênio no solo	99
4 DISCUSSÃO	102
5 CONCLUSÃO	105
REFERÊNCIAS	106
MATERIAL SUPLEMENTAR	110
CONCLUSÃO GERAL	112

INTRODUÇÃO GERAL

O arroz (*Oryza sativa* L.) pertence à família Poaceae e é considerado uma cultura de importância global (Abo-Youssef et al., 2024). Além disso, é o alimento básico para cerca de metade da população (Zhao et al., 2020). Depois do milho, o arroz é o cereal mais consumido no mundo (Thorat et al., 2024). Atualmente, no Brasil, o arroz ocupa o terceiro lugar em área cultivada com culturas anuais e 85% da produção brasileira concentra-se nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Tocantins, Maranhão e Mato Grosso (Conab, 2022). Estima-se uma produção de 10,8 milhões de toneladas de arroz para a safra nacional 2023/24 (Conab, 2024). Com o aumento da população mundial, estima-se um aumento significativo na demanda de arroz (Shah et al., 2023). Assim, a melhoria no rendimento de grãos e da qualidade nutricional desse cereal está ligada à segurança alimentar global (Shah et al., 2023).

A baixa disponibilidade de minerais, como o selênio (Se) e o zinco (Zn), nos produtos agrícolas, afeta negativamente a saúde de um grande número de pessoas em todo o mundo (Roda et al., 2020). Neste sentido, o enriquecimento de alimentos básicos, como o trigo e arroz, através da biofortificação agrônômica com Se, Zn e outros minerais de interesse, é uma estratégia para melhorar a ingestão desses elementos pela população (Roda et al., 2020). Por exemplo, a fertilização de plantas de arroz com doses crescentes de nitrogênio melhorou a absorção e o acúmulo de Se nos grãos de arroz, mediada pela regulação positiva de NRT1.1B, um transportador de nitrato que também transporta Se da raiz para a parte aérea (Zhang et al., 2019; Teixeira et al., 2021). De forma semelhante, NRT1.1B também é regulado positivamente em função da disponibilidade de Zn em arroz (Ji et al., 2022), sugerindo que a absorção e o acúmulo de Se nos grãos podem ser incrementados em função da fertilização com Zn. Além disso, a suplementação das plantas com Se e Zn pode modificar a concentração de outros minerais e proteínas nos grãos de arroz. Por exemplo, a adição de 10 μ M de selenito de sódio às plantas de arroz melhorou as concentrações de N, Ca, Fe, Se e proteínas, enquanto tendeu a reduzir as concentrações de Mn, Cu e Zn nos grãos de arroz em resposta ao aumento da adubação nitrogenada (Teixeira et al., 2021). Neste sentido, pesquisas voltadas para o cultivo de plantas de arroz fertilizadas com Se, Zn e outros minerais de interesse, são necessários para desenvolver estratégias para melhorar o desempenho produtivo das plantas e a qualidade nutricional dos grãos.

Durante a estação de cultivo das plantas, a disponibilidade de nutrientes nos solos agrícolas varia consideravelmente (Gao et al., 2019). O Zn e o nitrogênio, por exemplo, são minerais essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas, e a deficiência desses

elementos são frequentemente fatores limitantes na produção de plantas de arroz (Ji et al., 2022). O Zn é o principal micronutriente requerido para o crescimento e produção das plantas (Vadlamudi et al., 2020). O Zn participa da ativação de enzimas que regulam diversos processos importantes nos vegetais, incluindo desenvolvimento do grão de pólen, metabolismo de ácidos nucleicos, expressão gênica, fotossíntese, síntese de proteínas, divisão celular e biossíntese de hormônios (Ei et al., 2020; Archana et al., 2024). O Zn é absorvido pelas raízes de arroz principalmente na forma de Zn^{2+} . A absorção do Zn pelas raízes e a translocação do elemento pela planta é mediada por transportadores da família ZIP (Bashir et al., 2012; Kawakami e Bhullar, 2018). O nitrogênio é o nutriente requerido em maior quantidade pelas plantas e afeta as características fisiológicas e a produção de biomassa, além de regular a fotossíntese, a respiração e síntese proteica nas plantas (Jiaying et al., 2022). O arroz absorve nitrogênio preferencialmente na forma amoniacal. Entretanto, devido ao processo de nitrificação cerca de 40% do nitrogênio absorvido pelas raízes está na forma de nitrato, mesmo em áreas de arroz irrigado (Meng et al., 2019).

O Se, por outro lado, embora não seja considerado essencial para as plantas, em baixas concentrações, é considerado um elemento benéfico para o crescimento e desenvolvimento das plantas (Boldrin et al., 2013; Lima et al., 2019). O Se melhora o metabolismo do carbono e do nitrogênio, incrementando a produção de biomassa das plantas e a biossíntese de proteínas (Wang et al., 2012; Reis et al., 2020; Lei et al., 2022). Além disso, o Se aumenta a eficiência do sistema antioxidante em plantas, melhorando a tolerância das plantas a estresses bióticos e abióticos (Ikram et al., 2024). O Se pode interagir de forma antagonista ou sinérgica na absorção e utilização de minerais pelas plantas, modificando o status nutricional da planta (Ikram et al., 2024). Em condições de estresse, por exemplo, muitos estudos relataram maior absorção e utilização de nutrientes pelas plantas após a aplicação de Se, principalmente de minerais que são cofatores enzimáticos (Singh et al., 2018; Bhadwal e Sharma, 2022; Ikram et al., 2024). Entretanto, o Se pode limitar a translocação de certos elementos por competir com outros minerais pelas vias de absorção e transporte em plantas, como é o caso do P e do S (Ribeiro et al., 2016; Gui et al., 2022; Ikram et al., 2024). Além disso, o efeito do Se na capacidade da planta em absorver outros nutrientes é dependente da concentração de Se aplicada e da tolerância de cada cultura ao Se (Ikram et al., 2024).

O Se é absorvido pelas raízes das plantas predominantemente nas formas de selenato e selenito (Wang et al., 2020). O selenato encontra-se disponível em maior proporção em solos bem drenados e alcalinos, enquanto o selenito é predominante em zonas úmidas e anaeróbicas com pH neutro a ácido, tais como os solos de várzea onde o arroz irrigado é produzido (Lima

et al, 2018). O selenato, ao ser absorvido, é facilmente translocado para a parte aérea. Enquanto o selenito, ao ser absorvido, é rapidamente convertido em selenoaminoácidos e tende a se acumular na raiz (Longchamp et al., 2015; Wang et al., 2020). A absorção e o transporte de selenato em arroz são regulados por um transportador de sulfato, OsSULTR1.2 (Liang et al., 2019). Por outro lado, a absorção de selenito pelas raízes é mediada por OsPT2, um transportador de Pi (Zhang et al., 2014) e por OsNIP2.1, um transportador de influxo de silício (Zhao et al., 2010). Além disso, OsNRT1.1B, um transportador de absorção de nitrato, pode aumentar a absorção de Se orgânico pelas raízes de plantas de arroz (Zhang et al., 2019).

As plantas podem modificar vários processos fisiológicos para ajustar as mudanças na disponibilidade de nutrientes no solo ao seu crescimento e desenvolvimento, e os hormônios desempenham papel importante nessa resposta (Gao et al., 2019). Os hormônios modulam os processos de absorção, transporte e utilização de minerais, ao passo que os minerais podem influenciar a biossíntese, a translocação, o acúmulo e a homeostase hormonal (Ikram et al., 2024). Por exemplo, a fertilização de plantas de arroz com Zn estimula a biossíntese de citocininas na planta, melhorando o rendimento de grãos e o status de Zn na planta (Gao et al., 2019). De forma semelhante, o aumento na disponibilidade de nitrogênio, particularmente na forma de nitrato, aumenta a expressão de genes da biossíntese de citocinina e os níveis do hormônio nas raízes e parte aérea de plantas de arroz (Chen et al., 2022). Além disso, variações na disponibilidade de nitrato no meio de cultivo podem desencadear alterações morfológicas, mediadas pela citocinina, em raízes de *Arabidopsis* e modular o status de nitrato na planta (Pavlů et al., 2018). Os hormônios também influenciam as respostas das plantas em resposta ao Se. O Se pode interagir com os hormônios para melhorar a tolerância a estresses e o estado nutricional das plantas (Ikram et al., 2024). As citocininas, por exemplo, regulam negativamente o estresse por Se em *Arabidopsis*. Plantas de *Arabidopsis* mutantes deficientes na biossíntese de citocininas apresentam maior tolerância ao Se por apresentarem absorção reduzida desse elemento pelas raízes (Jiang et al., 2019). No entanto, pouco é conhecido sobre o efeito do Se na biossíntese e no metabolismo de citocininas em plantas de arroz. O Se e a citocinina também podem modificar o metabolismo de açúcares em plantas (Malheiros et al., 2019; Chai et al., 2023). Todavia, a interação entre o Se e as citocininas no metabolismo de açúcares e no status nutricional de plantas de arroz precisa ser mais investigada.

As citocininas desempenham importante papel em diversos processos do crescimento e desenvolvimento das plantas (Wang et al., 2020). Dependendo da concentração, as citocininas estimulam o crescimento da parte aérea (Li et al., 2013), mas inibem o crescimento radicular (Rivas et al., 2022), alterando a razão raiz-parte aérea das plantas (Scheible et al., 1997). A

função da citocinina tem sido relacionada às mudanças na disponibilidade de nutrientes (Ramireddy et al., 2014). O aumento na disponibilidade de nitrato, por exemplo, aumenta a expressão de genes que codificam para *isopentenil transferase (IPT)* e *citocromo P450 monooxigenase (CYP735A)*, resultando no acúmulo de citocinina e inibição do alongamento da raiz primária do arroz (Pavlů et al., 2018; Shah et al., 2023). Além disso, as citocininas regulam negativamente a expressão dos genes da *expansina (EXP)* e da *xiloglucana endotransglucosilase/hidrolase (XTH)*, modificando a dinâmica da parede celular e resultando na inibição da expansão da raiz primária em arroz (Pavlů et al., 2018; Shah et al., 2023). O Se também modifica a arquitetura do sistema radicular de plântulas de arroz por meio de alterações na biossíntese de hormônios (Malheiros et al., 2019). Em baixas concentrações, o selenito pode estimular o alongamento da raiz primária e o número de raízes laterais em tabaco (Jia et al., 2018). Por outro lado, o Se pode reduzir o comprimento e o número de raízes laterais enquanto estimula o alongamento da raiz principal em arroz, através de alterações nas concentrações de auxina e etileno (Malheiros et al., 2019). No entanto, pouco se conhece sobre o efeito do Se na regulação do metabolismo das citocininas e no controle do crescimento de plântulas de arroz cultivadas sob diferentes concentrações de nitrato.

A aplicação de citocininas aumenta a atividade do meristema apical da inflorescência durante o período reprodutivo de plantas de arroz, incrementando o número de órgãos reprodutivos nas panículas e, conseqüentemente, o número de grãos produzidos (Li et al., 2013). As citocininas atuam diretamente na modulação da arquitetura da panícula do arroz e melhora os principais componentes de rendimento de grãos, como o número de ramificações primárias, o número de grãos por panícula e a biomassa de grãos (Peleg et al., 2011; Wang et al., 2020; Chen et al., 2023). Adicionalmente, a aplicação de citocininas pode melhorar significativamente o processo de enchimento de grãos, aumentando as taxas fotossintéticas e a produção de carboidratos, além de modular as relações fonte e dreno (Peleg et al., 2011; Javid et al., 2011; Chen et al., 2023). Embora o Se possa melhorar as taxas fotossintéticas e a produção de biomassa, o efeito da suplementação com Se em plantas de arroz sobre a produção de grãos é menos evidente (Teixeira et al., 2021). O fornecimento de selenato ou selenito de sódio não alterou o rendimento de grãos de plantas de arroz, mas melhorou o conteúdo de Se nos grãos (Boldrin et al., 2013; Lessa et al., 2019). De forma semelhante, a suplementação de plantas de arroz com selenito de sódio em combinação com doses crescentes de nitrogênio também não alterou o rendimento de grãos (Teixeira et al., 2021). No entanto, os efeitos da interação entre o Se e as citocininas sobre o rendimento de grãos de arroz precisam ser melhor investigados. As citocininas também desempenham um papel importante na resposta a variações nos níveis

de nutrientes no ambiente de cultivo das plantas. As citocininas podem regular negativamente a expressão de transportadores de minerais, particularmente de micronutrientes, podendo comprometer a absorção de importantes minerais pelas raízes de arroz e, conseqüentemente, modificar a concentração de minerais nos grãos das plantas de arroz (Gao et al., 2019). Todavia, não está claro se a absorção e acúmulo de Se em grãos de arroz são modificados pelas citocininas. Além disso, é necessário esclarecer o papel do Se na regulação do status nutricional de plantas de arroz em resposta a aplicação de citocininas.

Para compreender melhor o papel das citocininas durante o crescimento vegetativo e reprodutivo das plantas de arroz em resposta a disponibilidade de Se, Zn e nitrato, esta tese foi organizada em três capítulos (Figura 1). Dada a importância do Se e do Zn na dieta humana, no capítulo 1 apresentou-se os efeitos da suplementação com Zn e Se no desenvolvimento das plantas de arroz e na qualidade nutricional dos grãos. Além disso, foram explorados os efeitos da aplicação de Zn e Se nos níveis de citocininas e suas implicações no crescimento e desenvolvimento das plantas de arroz. No capítulo 2 foi investigado se o Se induz mudanças na interação entre o fornecimento de nitrato e a biossíntese de citocininas para mediar o controle do crescimento da parte aérea e das raízes de plântulas de arroz. No capítulo 3 foram investigados os efeitos da citocinina e do Se no enchimento de grãos e na qualidade nutricional dos grãos de arroz.

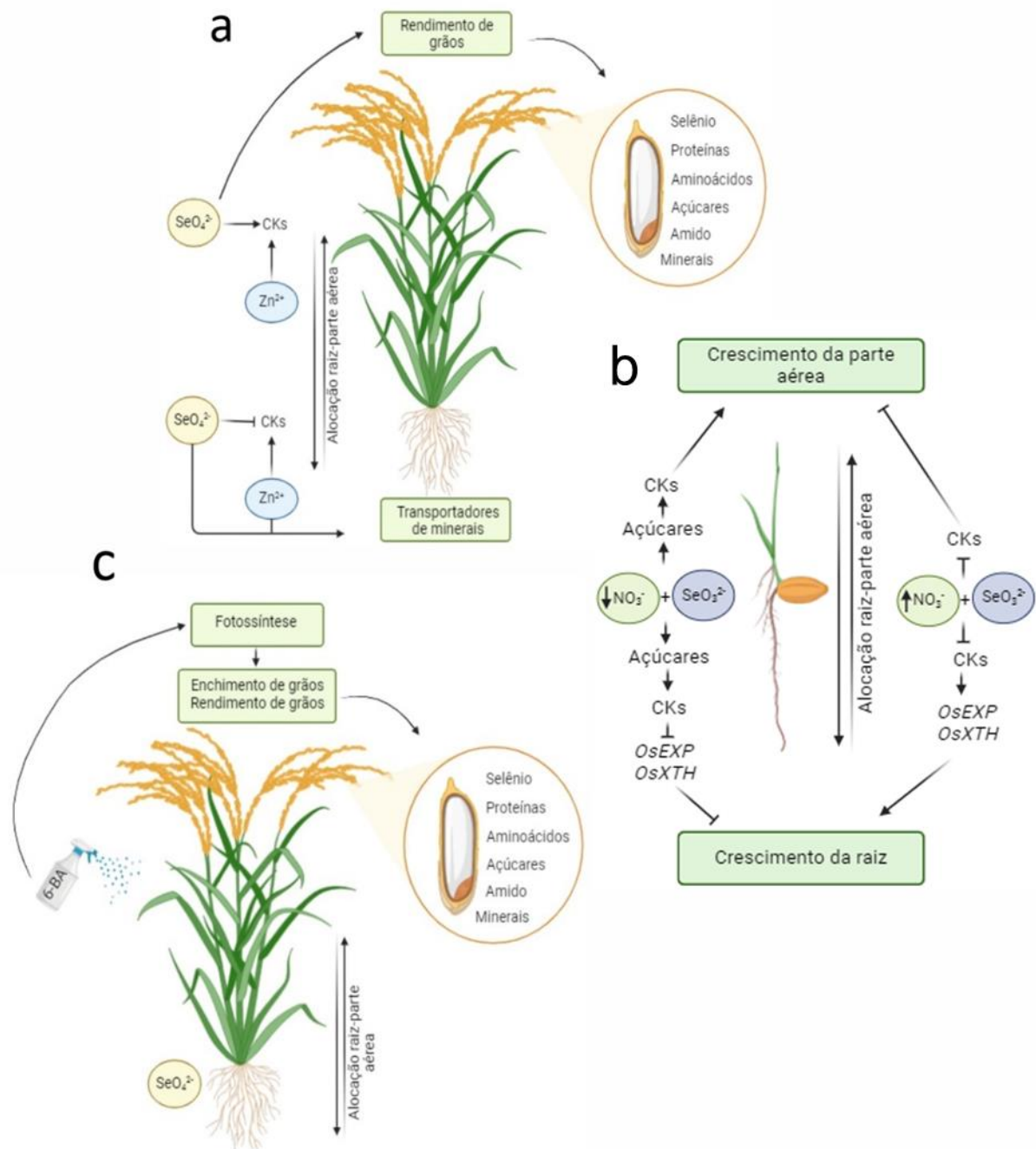


Figura 1. Esquema mostrando os possíveis efeitos entre Se, Zn, nitrato e citocininas no desenvolvimento das plantas de arroz. **a.** O objetivo foi estudar os efeitos da suplementação combinada de Zn e Se no desenvolvimento das plantas de arroz e na qualidade nutricional dos grãos (Capítulo 1). **b.** O Se pode induzir mudanças na interação entre o fornecimento de nitrato e a biossíntese de citocininas para mediar o controle do crescimento da parte aérea e das raízes, bem como a alocação de biomassa raiz-parte aérea em plântulas de arroz (Capítulo 2). **c.** Possíveis efeitos da citocinina e do Se no enchimento de grãos e na qualidade nutricional do arroz (Capítulo 3).

REFERÊNCIAS

- Abo-Youssef, M. I.; Abd El-Aty, M. S.; Yousef, S. A.; Salama, A. A.; Ibrahim, O. M.; Eweda, M. A.; AbdElgawad, H.; El-Tahan, A. M. An Analysis of the Total Protein and Genetic Components for Yield and Its Constituents in some Hybrid Rice (*Oryza sativa* L.). *Egyptian Journal of Botany*, v. 64, p. 193-209. <https://doi.org/10.21608/ejbo.2023.224367.2417>
- Archana, B.; Bindhu, J. S.; Pillai, P. S.; John, J.; Meera, A. V. Zinc nutrition in rice-based cropping systems: A comprehensive review. *Journal of Experimental Agriculture International*, v. 46, p. 574-583, 2024. <https://doi.org/10.9734/JEAI/2024/v46i52413>.
- Bashir, K.; Ishimaru, Y.; Nishizawa, N. K. Molecular mechanisms of zinc uptake and translocation in rice. *Plant and soil*, v. 361, p. 189–201, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1240-5>
- Bhadwal, S.; Sharma, S. Selenium alleviates physiological traits, nutrient uptake and nitrogen metabolism in rice under arsenate stress. *Environmental science and pollution research international*, v. 29, p. 70862–70881, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-20762-5>
- Boldrin, P. F.; Faquin, V.; Ramos, S. J.; Boldrin, K. V. F.; Ávila, F. W.; Guilherme, L. R. G. Soil and foliar application of selenium in rice biofortification. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 31, p. 238-244, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.06.002>.
- Chai, L.; Wang, H.; Yu, H.; Pang, E.; Lu, T.; Li, Y.; Jiang, W.; Li, Q. Girdling promotes tomato fruit enlargement by enhancing fruit sink strength and triggering cytokinin accumulation. *Frontiers in plant science*, v. 14, e1174403, 2023. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1174403>
- Chen, Y.; Fang, W.; Chen, S.; Zhang, Y.; Ansah, E. O.; An, G.; Xiong, F.; Wu, Y. Effects of endogenous cytokinin on physicochemical properties of superior and inferior grain starch in rice. *Die Starke*, v. 75, p. 1–12, 2023. <https://doi.org/10.1002/star.202200151>.
- Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) (2022). Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos, Brasília, v. 9, Safra 2021/22.
- Companhia Nacional de Abastecimento (Conab). Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos: Safra 2023/24, 8º Levantamento, janeiro/2024. Brasília, DF: Conab. 2024.
- Ei, H. H.; Zheng, T.; Farooq, M. U.; Zeng, R.; Su, Y.; Zhang, Y.; Liang, Y.; Tang, Z.; Ye, X.; Jia, X.; Zhu, J. Impact of selenium, zinc and their interaction on key enzymes, grain yield, selenium, zinc concentrations, and seedling vigor of biofortified rice. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 27, p. 16940–16949, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08202-8>.
- Gao, S.; Xiao, Y.; Xu, F.; Gao, X.; Cao, S.; Zhang, F.; Wang, G.; Sanders, D.; Chu, C. Cytokinin-dependent regulatory module underlies the maintenance of zinc nutrition in rice. *New Phytologist*, v. 224, p. 202-215, 2019. <https://doi.org/10.1111/nph.15962>.

- Gui, J.Y.; Rao, S.; Huang, X.; Liu, X.; Cheng, S.; Xu, F. Interaction between selenium and essential micronutrient elements in plants: A systematic review. *The Science of the total environment*, v. 853, p. 158673, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158673>
- Ikram, S.; Li, Y.; Lin, C.; Yi, D.; Heng, W.; Li, Q.; Tao, L.; Hongjun, Y.; Weijie, J. Selenium in plants: A nexus of growth, antioxidants, and phytohormones. *Journal of plant physiology*, v. 296, e154237, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2024.154237>
- Javid, M. G.; Sorooshzadeh, A.; Sanavy, S. A. M. M.; Allahdadi, I.; Moradi, F. Effects of the exogenous application of auxin and cytokinin on carbohydrate accumulation in grains of rice under salt stress. *Plant growth regulation*, v. 65, p. 305–313, 2011. <https://doi.org/10.1007/s10725-011-9602-1>.
- Ji, C.; Li, J.; Jiang, C.; Zhang, L.; Shi, L.; Xu, F.; Cai, H. Zinc and nitrogen synergistic act on root-to-shoot translocation and preferential distribution in rice. *Journal of Advanced Research*, v. 35, p. 187-198, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.04.005>.
- Jia, H.; Song, Z.; Wu, F.; Li, Y.; Han, D.; Yang, Y.; Zhan, S.; Cui, H. Low selenium increases the auxin concentration and enhances tolerance to low phosphorous stress in tobacco. *Environmental and Experimental Botany*, v. 153, p. 127-134, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.05.017>.
- Jiang, L.; Liu, C.; Cao, H.; Chen, Z.; Yang, J.; Cao, S.; Wei, Z. The role of cytokinin in selenium stress response in Arabidopsis. *Plant science: an international journal of experimental plant biology*, v. 281, p. 122–132, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.01.028>
- Jiaying, M. A.; Tingting, C. A.; Jie, L. A. B.; Weimeng, F. A.; Baohua, F.; Guangyan, L. A.; Hubo, L. A.; Juncai, L. A. B.; Zhihai, W. B.; Longxing, T. A.; Guanfu, F. Functions of nitrogen, phosphorus and potassium in energy status and their influences on rice growth and development. *Rice science*, v. 29, p. 166–178, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2022.01.005>.
- Kawakami, Y.; Bhullar, N.K. Molecular processes in iron and zinc homeostasis and their modulation for biofortification in rice. *Journal of Integrative Plant Biology*, v. 60, p.1181-1198, 2018. <https://doi.org/10.1111/jipb.12751>.
- Lei, Z.; Li, Q.; Tang, Y.; Zhang, H.; Han, C.; Wang, X.; Zhao, X.; Shi, G. Selenium enhanced nitrogen accumulation in legumes in soil with rhizobia bacteria. *Journal of cleaner production*, v. 380, e134960, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.134960>
- Lessa, J. H. L.; Araujo, A. M.; Ferreira, L. A.; Júnior, E. C. S.; Oliveira, C.; Corguinha, A. P. B.; Martins, F. A. D.; Carvalho, H. W. P.; Guilherme, L. R. G.; Lopes, G. Agronomic biofortification of rice (*Oryza sativa* L.) with selenium and its effect on element distributions in biofortified grains. *Plant Soil*, v. 444, p. 331-342, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04275-8>
- Li, S.; Zhao, B.; Yuan, D.; Duan, M.; Qian, Q.; Tang, L.; Wang, B.; Liu, X.; Zhang, J.; Wang, J.; Sun, J.; Liu, Z.; Feng, Y. Q.; Yuan, L.; Li, C. Rice zinc finger protein DST enhances grain production through controlling Gnl1a/OsCKX2 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 110, p. 3167-3172, 2013. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300359110>.

- Liang, Y.; Su, Y.; Li, L.; Huang, X.; Panhwar, F.H.; Zheng, T.; Tang, Z.; Ei, H.H.; Farooq, M.U.; Zeng, R.; Zhang, Y.; Ye, X.; Jia, X.; Zheng, L.; Zhu, J. Quick selenium accumulation in the selenium-rich rice and its physiological responses in changing selenium environments. *BMC Plant Biology*, v. 19, p. 559, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2163-6>
- Lima, L.W.; Pilon-Smits, E.A.H.; Schiavon, M. Mechanisms of selenium hyperaccumulation in plants: A survey of molecular, biochemical and ecological cues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1862, p. 2343-2353, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.03.028>
- Longchamp, M.; Castrec-Rouelle, M.; Biron, P.; Bariac, T. Variations in the accumulation, localization and rate of metabolization of selenium in mature *Zea mays* plants supplied with selenite or selenate. *Food Chemistry*, v. 182, p. 128-135, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.137>
- Malheiros, R. S. P.; Costa, L. C.; Ávila, R. T.; Pimenta, T. M.; Teixeira, L. S.; Brito, F. A. L.; Zsögön, A.; Araújo, W. L.; Ribeiro, D. M. Selenium downregulates auxin and ethylene biosynthesis in rice seedlings to modify primary metabolism and root architecture. *Planta*, v. 250, p. 333–345, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03175-6>.
- Meng, F.; Xiang, D.; Zhu, J.; Li, Y.; Mao, C. Molecular mechanisms of root development in rice. *Rice*, v. 12, p. 1-10, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12284-018-0262-x>
- Pavlů, J.; Novák, J.; Koukalová, V.; Luklová, M.; Brzobohatý, B.; Černý, M. Cytokinin at the Crossroads of Abiotic Stress Signalling Pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, p. 2450, 2018. <https://doi.org/10.3390/ijms19082450>
- Peleg, Z.; Reguera, M.; Tumimbang, E.; Walia, H.; Blumwald, E. Cytokinin-mediated source/sink modifications improve drought tolerance and increase grain yield in rice under water-stress. *Plant biotechnology journal*, v. 9, p. 747–758, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2010.00584.x>.
- Ramireddy, E.; Chang, L.; Schmölling, T. Cytokinin as a mediator for regulating root system architecture in response to environmental cues. *Plant Signaling & Behavior*, v. 9, e27771, 2014. <https://doi.org/10.4161/psb.27771>
- Reis, H. P. G.; Barcelos, J. P. Q.; Silva, V. M.; Santos, E. F.; Tavanti, R. F. R.; Putti, F. F.; Young, S. D.; Broadley, M. R.; White, P. J.; Reis, A. R. Agronomic biofortification with selenium impacts storage proteins in grains of upland rice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 100, p. 1990-1997, 2020. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10212>
- Ribeiro, D. M.; Silva Júnior, D. D.; Cardoso, F. B.; Martins, A. O.; Silva, W. A.; Nascimento, V. L.; Araújo, W. L. Growth inhibition by selenium is associated with changes in primary metabolism and nutrient levels in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, cell & environment*, v. 39, p. 2235–2246, 2016. <https://doi.org/10.1111/pce.12783>
- Rivas, M. Á.; Friero, I.; Alarcón, M. V.; Salguero, J. Auxin-cytokinin balance shapes maize root architecture by controlling primary root elongation and lateral root development. *Frontiers in Plant Science*, v. 13, e836592, 2022. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.836592>.

- Roda, F. A.; Marques, I.; Batista-Santos, P.; Esquível, M. G.; Ndayiragije, A.; Lidon, F. C.; Swamy, B. P. M.; Ramalho, J. C.; Ribeiro-Barros, A. I. Rice biofortification with zinc and selenium: A transcriptomic approach to understand mineral accumulation in flag leaves. *Frontiers in Genetics*, v. 11, p. 543, 2020. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00543>.
- Scheible, W.-R.; Lauerer, M.; Schulze, E.-D.; Caboche, M.; Stitt, M. Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. *Plant Journal*, v. 11, p. 671–691, 1997. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1997.11040671.x>.
- Shah, S.; Cai, L.; Li, X.; Fahad, S.; Wang, D. Influence of cultivation practices on the metabolism of cytokinin and its correlation in rice production. *Food Energy Security*, v. 12, p. 488, 2023. <https://doi.org/10.1002/fes3.488>.
- Singh, R.; Upadhyay, A.K.; Singh, D.P. Regulation of oxidative stress and mineral nutrient status by selenium in arsenic treated crop plant *Oryza sativa*. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 148, p. 105–113, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.10.008>
- Teixeira, L. S.; Pimenta, T. M.; Brito, F. A. L.; Malheiros, R. S. P.; Arruda, R. S.; Araújo, W. L.; Ribeiro, D. M. Selenium uptake and grain nutritional quality are affected by nitrogen fertilization in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Reports*, v. 40, p. 871–880, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00299-021-02685-6>.
- Thorat, A.; Dahiphale, A.; Bodake, P.; Mhaskar, N.; Meshram, N.; Kadam, J.; Bhagat, S.; Khavanekar, O.; Parve, M.; Chavan, A.; Gavit, F. Impact of organic, inorganic, and integrated production systems on growth and yield of rice (*Oryza sativa* L.). *International Journal of Research in Agronomy*, v. 7, p. 183-187, 2024. <https://doi.org/10.33545/2618060X.2024.v7.ilc.205>
- Vadlamudi, K.; Upadhyay, H.; Singh, A.; Reddy, M. Influence of zinc application in plant growth: An Overview. *European Journal of Molecular & Clinical Medicine*, v. 7, p. 2321-2327, 2020.
- Wang, C.; Wang, G.; Gao, Y.; Lu, G.; Habben, J. E.; Mao, G.; Chen, G.; Wang, J.; Yang, F.; Zhao, X.; Zhang, J.; Mo, H.; Qu, P.; Liu, J.; Greene, T.W. A cytokinin-activation enzyme-like gene improves grain yield under various field conditions in rice. *Plant molecular biology*, v. 102, p. 373–388, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11103-019-00952-5>.
- Wang, Y.D.; Wang, X.; Wong, Y.S. Proteomics analysis reveals multiple regulatory mechanisms in response to selenium in rice. *Journal of Proteomics*, v. 75, p. 1849-1866, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.12.030>
- Zhang, L.; Hu, B.; Deng, K.; Gao, X.; Sun, G.; Zhang, Z.; Li, P.; Wang, W.; Li, H.; Zhang, Z.; Fu, Z.; Yang, J.; Gao, S.; Li, L.; Yu, F.; Li, Y.; Ling, H.; Chu, C. NRT1.1B improves selenium concentrations in rice grains by facilitating Selenomethionine translocation. *Plant Biotechnology Journal*, v. 17, p. 1058-1068, 2019. <https://doi.org/10.1111/pbi.13037>
- Zhang, L.; Hu, B.; Li, W.; Che, R.; Deng, K.; Li, H.; Yu, F.; Ling, H.; Li, Y.; Chu, C. OsPT2, a phosphate transporter, is involved in the active uptake of selenite in rice. *New Phytol*, v. 201, p. 1183–1191, 2014. <https://doi.org/10.1111/nph.12596>

Zhao, M.; Lin, Y.; Chen, H. Improving nutritional quality of rice for human health. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 133, p. 1397-1413, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03530-x>

Zhao, X. Q.; Mitani, N.; Yamaji, N.; Shen, R.F.; Ma, J.F. Involvement of silicon influx transporter OsNIP2;1 in selenite uptake in rice. *Plant Physiology*, v. 153, p.1871-1877, 2010. <https://doi.org/10.1104/pp.110.157867>

**CAPÍTULO I – EFEITOS DA APLICAÇÃO DE SELÊNIO E ZINCO NA PRODUÇÃO
E QUALIDADE NUTRICIONAL DE GRÃOS DE PLANTAS DE ARROZ (*Oryza sativa*
L.)**

RESUMO

A deficiência de selênio (Se) e zinco (Zn) na dieta humana é um problema de saúde global que pode ser minimizado pelo enriquecimento de culturas básicas na alimentação com Se e Zn. No entanto, não está claro como a aplicação combinada de Se e Zn afetam o rendimento e a qualidade nutricional do grão de arroz. No presente estudo, o Se reverteu parcialmente os efeitos negativos do aumento da concentração de citocininas no sistema radicular nas plantas tratadas com Zn, ao passo que melhorou o rendimento de grãos dessas plantas em função do acúmulo de citocininas nas panículas de arroz. Além disso, a concentração de Se nos grãos de arroz foi positivamente associada ao fornecimento de Zn às plantas. Isso foi favorecido pelo aumento da expressão de *NRT1.1B*, que codifica um transportador de nitrato, nas raízes e folhas bandeira das plantas de arroz supridas com Zn. Além disso, o Se elevou a expressão de *OsSULTRI.2*, *OsPT2* e *OsNIP2.1* na raiz e nas folhas bandeira, aumentando a capacidade de absorção de Se pela raiz, bem como o acúmulo de Se nos grãos. A aplicação de Se não alterou a expressão de *OsZIP1*, *OsZIP4*, *OsZIP6* e *OsZIP8* nas raízes e nas folhas bandeira de arroz. Assim, o aumento na concentração de Zn nas raízes e grãos das plantas de arroz tratadas com Zn foi independente da aplicação de Se. Adicionalmente, a suplementação das plantas com Se promoveu efeito positivo na concentração de proteínas nos grãos em resposta a disponibilidade de Zn, ao passo que as concentrações de N, S, Mg, Ca, Fe e Cu nos grãos aumentaram independente do fornecimento de Zn. De maneira geral, os resultados revelaram que o Se e o Zn atuam de forma sinérgica para melhorar o rendimento e a composição nutricional de grãos de arroz.

Palavras-chave: Expressão gênica; Citocininas; Composição nutricional de grãos; Rendimento de grãos.

ABSTRACT

The deficiency of selenium (Se) and zinc (Zn) in the human diet is a global health problem that can be minimized by enriching staple crops with Se and Zn. However, it is not clear how the combined application of Se and Zn affects the yield and nutritional quality of rice grains. In the present study, Se partially reversed the negative effects of increased cytokinin concentration in the root system of Zn-treated plants, while improving the grain yield of these plants due to cytokinin accumulation in rice panicles. Furthermore, the Se concentration in rice grains was positively associated with Zn supply to the plants. This was facilitated by increased expression of *NRT1.1B*, which encodes a nitrate transporter, in the roots and flag leaves of Zn-supplied rice plants. Additionally, Se elevated the expression of *OsSULTR1.2*, *OsPT2*, and *OsNIP2.1* in the root and flag leaves, enhancing Se absorption capacity by the root as well as Se accumulation in the grains. Se application did not alter the expression of *OsZIP1*, *OsZIP4*, *OsZIP6*, and *OsZIP8* in the roots and flag leaves of rice. Thus, the increase in Zn concentration in the roots and grains of Zn-treated rice plants was independent of Se application. Additionally, Se supplementation had a positive effect on protein concentration in the grains in response to Zn availability, while concentrations of N, S, Mg, Ca, Fe, and Cu in the grains increased regardless of Zn supply. Overall, the results revealed that Se and Zn act synergistically to improve the yield and nutritional composition of rice grains.

Keywords: Gene expression; Cytokinins; Nutritional composition of grains; Grain yield.

1 INTRODUÇÃO

O selênio (Se) e o zinco (Zn) são nutrientes minerais essenciais para a saúde humana (Roda et al., 2020). A deficiência desses minerais constitui um grave problema de saúde pública (Avery e Hoffmann, 2018; Manguze et al., 2018). Estima-se que aproximadamente um terço da população mundial seja afetada pela deficiência de Zn e que cerca de um bilhão de pessoas sejam afetadas pela deficiência de Se (Jones et al., 2017; Menguer et al., 2018). A principal fonte de exposição ao Se e ao Zn para a maioria das pessoas se dá pelo consumo de cereais (Manguze et al., 2018; Zhang e Chu, 2022). Entretanto, a concentração de Zn e Se nos cereais é relativamente baixa, reflexo da baixa disponibilidade desses minerais nos solos para serem absorvidos pelas plantas (Manguze et al., 2018; Alam et al., 2020). Uma estratégia para elevar o conteúdo de Zn e Se nos cereais é a biofortificação agrônômica (Zhang e Chu et al., 2022). A biofortificação agrônômica tem como objetivo elevar a concentração de minerais de interesse na parte comestível das plantas, através da introdução destes minerais via adubação (Alam et al., 2020). Dessa forma, a fertilização com Zn e Se de culturas consideradas básicas para a população, como o arroz (*Oryza sativa* L.), representa uma forma eficiente de melhorar a ingestão desses minerais pela população (Prauchner, 2014; Lidon et al., 2019). O arroz é a base da alimentação para mais da metade da população mundial e é uma importante fonte de calorias e minerais para a dieta humana (Ramos et al., 2022). Assim, a cultura do arroz tem sido alvo de estudos de biofortificação com minerais essenciais à saúde humana (Zhang e Chu, 2022).

As raízes das plantas de arroz obtêm Se do solo predominantemente nas formas de selenato e selenito (Wang et al., 2020). Ao ser absorvido, o selenato é facilmente transportado das raízes para a parte aérea onde é assimilado a selenocisteína e selenometionina (Longchamp et al., 2015; Wang et al., 2020). Por outro lado, o selenito, após ser absorvido, é transferido para os plastídios da raiz onde é rapidamente metabolizado a selenometionina e tende a se acumular nas raízes (Wang et al., 2020). A absorção e o transporte de selenato em arroz são regulados por um transportador de sulfato, *OsSULTR1.2* (Liang et al., 2019). Em contrapartida, a absorção de selenito pelas raízes é mediada por *OsPT2*, um transportador de Pi (Zhang et al., 2014) e por *OsNIP2.1*, um transportador de influxo de silício (Zhao et al., 2010). Entretanto, o acúmulo de Se nas raízes de arroz catalisado por *OsSULTR1.2*, *OsNIP2.1* e *OsPT2* foi acompanhado por um leve aumento no transporte para a parte aérea (Gupta e Gupta, 2017). *OsNRT1.1B*, um transportador de absorção de nitrato, aumenta a absorção de Se orgânico pelas raízes de plantas de arroz (Zhang et al., 2019). Além disso, a superexpressão de *OsNRT1.1B*, que codifica um transportador de nitrato no arroz, melhorou significativamente a translocação de

selenometionina das raízes para a parte aérea, o que foi associado ao aumento do acúmulo de Se no grão quando as plantas de arroz foram fertilizadas com Se (Zhang et al., 2019). Como o Zn regula positivamente a expressão de *NRT1.1B* em arroz (Ji et al., 2022), é possível que a capacidade de *NRT1.1B* de regular a absorção e o transporte de Se em plantas de arroz seja dependente da disponibilidade de Zn durante a estação de crescimento. O Zn é absorvido pelas raízes das plantas principalmente na forma de Zn^{2+} (Kawakami e Bhullar, 2018). A absorção e o transporte de Zn em arroz são regulados por transportadores da família ZIP, principalmente *OsZIP1*, *OsZIP4*, *OsZIP6* e *OsZIP8* (Kawakami e Bhullar, 2018; Ji et al., 2022). Entretanto, pouco se sabe sobre como a aplicação de Se afeta a captação e acumulação de Zn em plantas de arroz.

O Se não é considerado um nutriente essencial para as plantas (Boldrin et al., 2013). Entretanto, quando aplicado em baixas concentrações, proporciona efeitos benéficos (Lima et al., 2019). O fornecimento de Se pode regular de forma positiva a eficiência do sistema antioxidante, a taxa de assimilação de CO_2 e a transpiração, aumentando a produção de biomassa de plantas de arroz (Zhang et al., 2014; Malheiros et al., 2020; Andrade et al., 2018). Além disso, o aumento da absorção de Se pode afetar positivamente a produção de grãos de arroz como resultado do aumento do número de perfilhos por planta, grãos por panícula e porcentagem de grãos cheios (Liu et al., 2020). Adicionalmente, o Se afeta a concentração de proteínas como globulina, glutelina, prolamina e albumina bem como a concentração de minerais no grão de arroz (Teixeira et al., 2021). Por exemplo, o selenito aplicado ao solo reduziu a concentração de ferro, manganês, cobre e Zn nos grãos de arroz, ao mesmo tempo em que aumentou as concentrações de cálcio, magnésio e molibdênio em resposta ao aumento do fornecimento de nitrogênio (Teixeira et al., 2021). O arroz é uma boa fonte de elementos minerais importantes para a nutrição humana (Saleh et al., 2019). Nesse contexto, a fertilização com Zn também tem impacto direto na produção e na concentração de minerais nos grãos (Zulfiqar et al., 2021). Por exemplo, a fertilização com Zn aumentou o número de grãos por panícula e o índice de colheita das plantas de arroz, bem como o conteúdo de proteínas nos grãos (Nahar et al., 2020). Além disso, a fertilização com Zn aumentou as concentrações de ferro nos grãos (Fang et al., 2008), mas reduziu a concentração de fósforo no arroz (Wang et al., 2018). Esses resultados destacam a flexibilidade do Se e do Zn em modular a qualidade nutricional dos grãos do arroz. As relações entre diferentes nutrientes tem sido foco de vários estudos fisiológicos, trazendo evidências de que a alteração de um ou mais nutrientes no meio de cultivo das plantas pode afetar a concentração de outros nutrientes, seja de maneira

antagônica ou sinérgica (Ji et al., 2022). Até o momento, no entanto, pouco é conhecido sobre o efeito combinado do Se e do Zn na produção e na composição nutricional dos grãos de arroz.

O Zn é um elemento essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas (Ji et al., 2022). Esse micronutriente participa da ativação de enzimas que regulam diversos processos importantes nos vegetais, como a manutenção de membranas biológicas, fixação de carbono, síntese de proteínas, síntese de clorofilas, expressão gênica, fertilidade e síntese de hormônios vegetais (Ei et al., 2020). A fertilização com Zn tem um efeito direto na biossíntese das citocininas, afetando a produção e os níveis de Zn nos grãos de arroz (Gao et al., 2019). Além disso, as citocininas podem regular positivamente a atividade e função do meristema apical caulinar, que é um parâmetro determinante da produção de grãos em arroz (Li et al., 2013). Dessa forma, é possível que a fertilização com Zn eleve os níveis de citocinina no meristema apical de plantas de arroz aumentando a produção de grãos. Além disso, as citocininas podem alterar as relações fonte e dreno e modular a concentração de importantes minerais em arroz, como Zn, Fe e Mn (Peleg et al., 2011). Apesar dos relatos na literatura sobre o efeito do Zn no desenvolvimento reprodutivo do arroz, pouco se sabe atualmente sobre o efeito combinado do Zn e do Se no desenvolvimento reprodutivo e no armazenamento de produtos de reserva como amido, aminoácidos e proteínas nos grãos do arroz. Assim, o entendimento da relação entre a aplicação de Se e Zn em plantas de arroz abrirá novas perspectivas para melhorar a produção e a composição nutricional dos grãos.

Aqui testou-se a hipótese de que a absorção e o transporte de Se pelas raízes de arroz são aumentados pelo fornecimento de Zn, regulando, assim, a composição nutricional de grãos de arroz em termos de produtos de reserva e importantes minerais. Avaliou-se também os efeitos do Zn e do Se sobre a biossíntese de citocininas. Adicionalmente, foi avaliado o efeito combinado do fornecimento de Se e Zn no desenvolvimento das plantas de arroz, porque a variação na disponibilidade desses minerais durante a estação de crescimento das plantas pode modificar o crescimento vegetativo e reprodutivo do arroz (Gao et al., 2019; Teixeira et al., 2021).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e condições de cultivo

Sementes de arroz (*Oryza sativa* L. ssp *japonica* cv Oochikara) foram obtidas de plantas cultivadas em casa de vegetação em Viçosa (20° 45'S, 42° 54'W, 650 m altitude), Minas Gerais,

Brasil. A germinação das sementes e o crescimento inicial das plântulas foi feito conforme descrito por Malheiros et al. (2020). Em seguida, as plântulas foram cultivadas em vasos plásticos de 10 L de capacidade, contendo uma mistura 1:1 (v/v) de substrato comercial (Tropstrato HT, Mogi Mirim, Brasil) e solo. Todos os vasos foram preenchidos com 7,5 kg de solo experimental (com base no peso seco). As características químicas do solo experimental estão descritas na Tabela S1. As plantas de arroz foram mantidas até o final do ciclo em casa de vegetação com temperatura do ar controlada (30/25 °C, dia/noite) e iluminação natural. Durante a primeira semana as plantas foram irrigadas diariamente até atingir a capacidade de campo. Após a primeira semana foram aplicados 500 mL das seguintes soluções ao substrato de cultivo das plantas: 0 µM de selenato de sódio + 0 µM de zinco-EDTA (controle), 0 µM de selenato de sódio + 250 µM de zinco-EDTA, 10 µM de selenato de sódio + 0 µM de zinco-EDTA, 10 µM de selenato de sódio + 250 µM de zinco-EDTA. A solução de selenato de sódio foi aplicada semanalmente e a solução de zinco-EDTA quinzenalmente, ao longo do experimento. Nos demais dias da semana a irrigação foi feita até atingir a capacidade de campo.

2.2 Parâmetros produtivos

Para a determinação dos parâmetros de produtivos, as plantas foram coletadas ao final do ciclo e separadas em raízes, colmos, folhas e grãos. Os tecidos das plantas foram submetidos à secagem em estufa a 70°C com circulação forçada de ar, até atingir peso constante. Com base no valor de biomassa seca, obtido para cada uma das diferentes partes, foram estimados os parâmetros agronômicos: biomassa seca de raízes, colmos, folhas e grãos bem como a biomassa total e a razão raiz/parte aérea (g de massa seca radicular g⁻¹ de biomassa da parte aérea). Determinou-se, também, o índice de colheita (g de biomassa seca de grãos g⁻¹ de biomassa seca total) e o número de grãos de cada panícula.

2.3 Quantificação de citocininas

Foram quantificadas as seguintes formas de citocininas nas raízes e panículas jovens de plantas de arroz: zeatina, N⁶-isopenteniladenina (*iP*), zeatina ribosídeo (*ZR*) e N⁶-isopenteniladenosina (*iPR*). Para a quantificação de citocininas foram coletados cerca de 1 grama de raízes de plantas de arroz com 45 dias de idade e 1 grama de panículas jovens (< 1, 5 cm) de plantas de arroz no início do período reprodutivo. O material foi congelado e moído em

nitrogênio líquido e, posteriormente, acondicionado em freezer a -80°C até análise. A extração e determinação de citocinina por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foram realizadas de acordo com o método descrito por Song et al. (2013). Amostras padrão de fração de citocinina (zeatina, zeatina ribosídeo, N^6 -isopenteniladenina e N^6 -isopenteniladenosina) foram obtidas da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

2.4 Análise mineral

Cerca de cem grãos de cada tratamento foram selecionados das sementes produzidas de forma aleatória e descascados. Os grãos foram secos em estufa, a 60°C , até atingir peso constante e depois foram armazenados em sacos ziplock até a análise. Após secagem, os grãos foram triturados em moinho do tipo Willey (CINELAB CE-430; 8 lâminas, 1725 rpm, peneira de 20 mesh). As amostras (500 mg) foram submetidas a digestão nitro-perclórica (10:1, v/v) e analisadas quanto à concentração de P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe, Mn e Zn usando um espectrofotômetro de emissão ótica em plasma induzido (ICP-OES, Perkin-Elmer, Shelton, CT) conforme descrito por Wheal et al. (2011). A concentração de N nos grãos foi determinada conforme o método de combustão de (Muñoz-Huerta et al., 2013). A concentração de selênio nos grãos e na raiz foram determinados conforme El Mehdawi et al. (2018).

2.5 Análises bioquímicas

As análises bioquímicas foram realizadas nas mesmas amostras utilizadas para determinação mineral por ICP-OES. A extração e a quantificação das proteínas de reserva (albumina, prolamina, globulina e glutelina) e proteínas totais foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Reis et al. (2020), utilizando 100 mg de grãos moídos. A quantificação dos açúcares solúveis, amido e aminoácidos totais foi realizada conforme Cross et al. (2006), utilizando 50 mg de grãos moídos.

2.6 PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR)

A extração do RNA total dos tecidos da raiz e da folha bandeira, moídos e congelados, bem como a síntese de cDNA foram realizadas conforme descrito por Malheiros et al. (2020). As amostras de raízes e folhas bandeira foram coletadas no fim do dia. A RT-qPCR foi realizada

com uma mistura de cDNA, SYBR Green Master Mix e primers gene-específicos (Tabela S2) de acordo com Schippers et al. (2008). As sequências de oligonucleotídeos utilizadas para a expressão de *OsNRT1.1A*, *OsNRT1.1B*, *OsSULTR1.2*, *OsPT2*, *OsNIP2.1*, *ZIP1*, *ZIP4*, *ZIP6*, *ZIP8*, *CYP735A3* e *CYP735A4* foram retiradas de Ji et al. (2022), Teixeira et al. (2021), Liu et al. (2019) e Gao et al. (2019). O gene housekeeping do arroz *ACTIN* (Os03g50885) foi usado como controle interno para normalizar os dados de expressão gênica: $\Delta CT = CT(\text{gene}) - CT(\text{ACTIN})$, onde CT significa limiar de ciclo.

2.7 Análise estatística

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado com 4 tratamentos em esquema fatorial (2 x 2) composto por dois níveis de Zn e dois níveis de Se com quatro repetições cada. A unidade experimental do experimento foi composta por quatro plantas por vaso. Todos os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas pelo teste Tukey ($P < 0,05$), utilizando o software estatístico R.

3 RESULTADOS

3.1 O Se modula a biomassa e a produção de arroz em resposta à disponibilidade de Zn

De maneira geral a biomassa da parte aérea, a fotossíntese líquida e as demais características de crescimento das plantas de arroz não foram afetadas pelo fornecimento de Zn ou Se (Figura 1a, S1 e S2). A biomassa da raiz foi significativamente reduzida nas plantas tratadas com Se ou Zn individualmente, quando comparados com as plantas controle (Figura 1b). Entretanto, as plantas tratadas com a combinação de Zn e Se, apresentaram maior biomassa de raiz, em relação as plantas tratadas com Zn ou Se individualmente (Figura 1b). De forma semelhante, a suplementação das plantas com Se ou Zn individualmente reduziu a razão raiz/parte aérea, em relação às plantas controle (Figura 1c). Enquanto as plantas tratadas com Zn e Se em combinação apresentaram maior razão raiz/parte aérea em relação as plantas tratadas com Zn ou Se individualmente (Figura 1c). Todavia, não foi observado efeito significativos dos tratamentos sobre a produção de biomassa total das plantas de arroz (Figura 1d).

Tendo em vista que a disponibilidade de Zn no solo afeta a concentração de citocininas em plantas de arroz (Gao et al., 2019), foi avaliado a concentração de diferentes formas de citocinina nas raízes de plantas de arroz, em resposta a aplicação de Zn e Se. Foi observado que as raízes obtidas das plantas tratadas apenas com Zn apresentaram concentração de zeatina, N⁶-isopenteniladenina (*iP*), zeatina ribosídeo (*ZR*) e N⁶-isopenteniladenosina (*iPR*) superior em relação as raízes obtidas das plantas controle (Figura 1 e-h). A aplicação isolada de Se não alterou a concentração de zeatina, *iP*, *ZR* e *iPR* nas raízes das plantas de arroz, em relação as raízes das plantas controle (Figura 1 e-h). Em contraste, a aplicação de Se nas plantas tratadas com Zn reduziu as concentrações de zeatina, *iP*, *ZR* e *iPR* nas raízes em relação as plantas tratadas apenas com Zn (Figura 1 e-h). Adicionalmente, foi avaliado a expressão dois parálogos de *CYP735A*, *CYP735A3* e *CYP735A4*, relacionados com a biossíntese de citocininas, nas raízes e nas folhas das plantas de arroz. Os níveis de transcritos de *CYP735A3* e *CYP735A4* não foram alterados nas folhas das plantas de arroz em resposta a aplicação de Zn e Se individualmente ou em combinação (Figura 1 i-j). Entretanto, as plantas tratadas com Zn apresentaram níveis mais elevados de transcritos de *CYP735A* e *CYP735B* na raiz em relação as plantas controle ou àquelas tratadas apenas com Se (Figura 1 i-j).

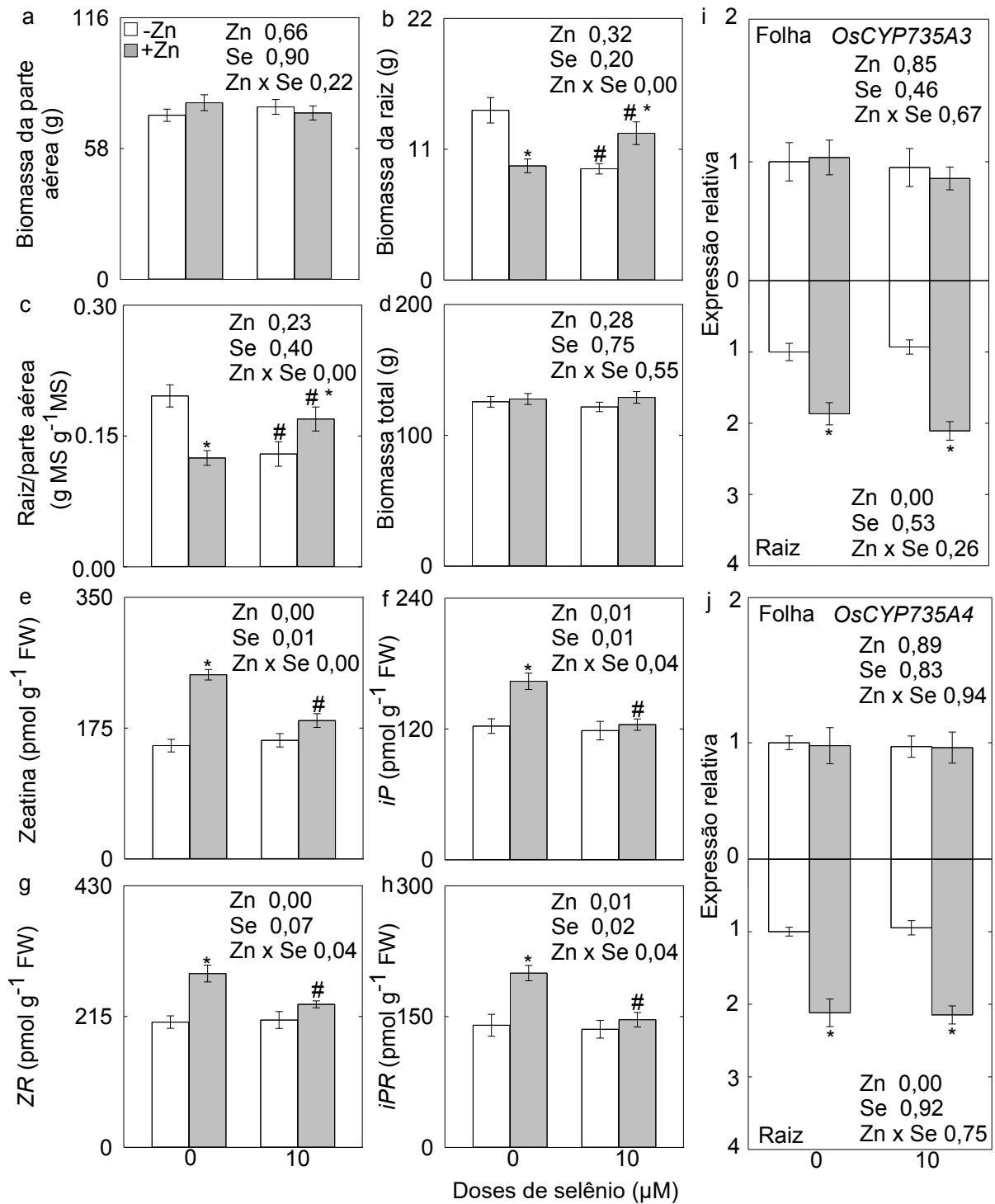


Figura 1. Efeito da aplicação de Se e Zn, isolados ou em combinação, nos parâmetros de crescimento e no acúmulo de diferentes formas de citocinina na raiz e expressão de gênica de genes de biossíntese de citocininas nas raízes e folhas bandeira de plantas de arroz. **a.** Biomassa da parte aérea. **b.** Biomassa da raiz. **c.** Razão raiz/parte aérea. **d.** Biomassa total. **e.** Zeatina. **f.** N⁶-isopenteniladenina **g.** Zeatina ribosídeo **h.** N⁶-isopenteniladenosina. **i.** Expressão relativa de CYP735A3 **j.** Expressão relativa de CYP735A4. Asteriscos representam diferença estatística entre os tratamentos com Zn dentro da mesma condição de Se. Hashtags representam diferença estatística entre os tratamentos com Se dentro da mesma condição de Zn. Teste Tukey (P < 0,05). Os dados são média ± erro padrão de um experimento, com quatro repetições cada.

Observou-se ainda que plantas tratadas com Zn e Se em combinação apresentaram incremento no número de grãos por panícula de 25% em relação as tratadas apenas com Se e 14% em relação as plantas tratadas apenas com Zn (Figura 2b). Entretanto, não foi observado nenhum efeito significativo do Se e do Zn, aplicados individualmente, no número de grãos por panícula, em relação as plantas controle (Figura 2b). A biomassa de grãos e o índice de colheita das plantas de arroz não foram alterados pelo fornecimento de Zn ou Se individualmente, em relação ao controle (Figura 2c-d). Entretanto, as plantas tratadas com Zn e Se em combinação apresentaram maior biomassa de grãos, em relação as plantas tratadas com Se ou Zn individualmente (Figura 2a,c). O índice de colheita das plantas tratadas com a combinação de Zn e Se aumentou em 18% em relação as plantas tratadas apenas com Se e 6% em relação as plantas tratadas apenas com Zn (Figura 2d). O número de panículas por planta e o número de perfilhos por planta não foi afetado pelo fornecimento de Zn ou Se, individualmente ou em combinação (Figuras 2e e S2). O tratamento das plantas de arroz com Zn ou Se individualmente reduziu a porcentagem de grãos cheios, em relação as plantas controle (Figura 2f). Em contraste, as plantas tratadas com Zn e Se em combinação, apresentaram maior porcentagem de grãos cheios em relação as plantas tratadas com Zn e Se aplicados de forma isolada (Figura 2f).

Dada as evidências de que as citocininas regulam a produção de grãos em plantas de arroz em função da disponibilidade de Zn (Gao et al., 2019), quantificou-se a concentração de diferentes formas de citocinina em panículas jovens de plantas de arroz, em resposta a aplicação de Zn e Se. Foi observado que as panículas jovens obtidas das plantas tratadas com Zn e Se em combinação apresentaram concentrações de zeatina, *iP*, *ZR* e *iPR* expressivamente mais elevadas em relação as panículas obtidas de plantas tratadas com Zn ou Se aplicados de forma isolada (Figura 2g-j). Entretanto, a aplicação de Zn e Se individualmente, não alterou significativamente a concentração de zeatina, *iP*, *ZR* e *iPR* nas panículas, em relação as panículas obtidas das plantas do controle (Figura 2g-j).

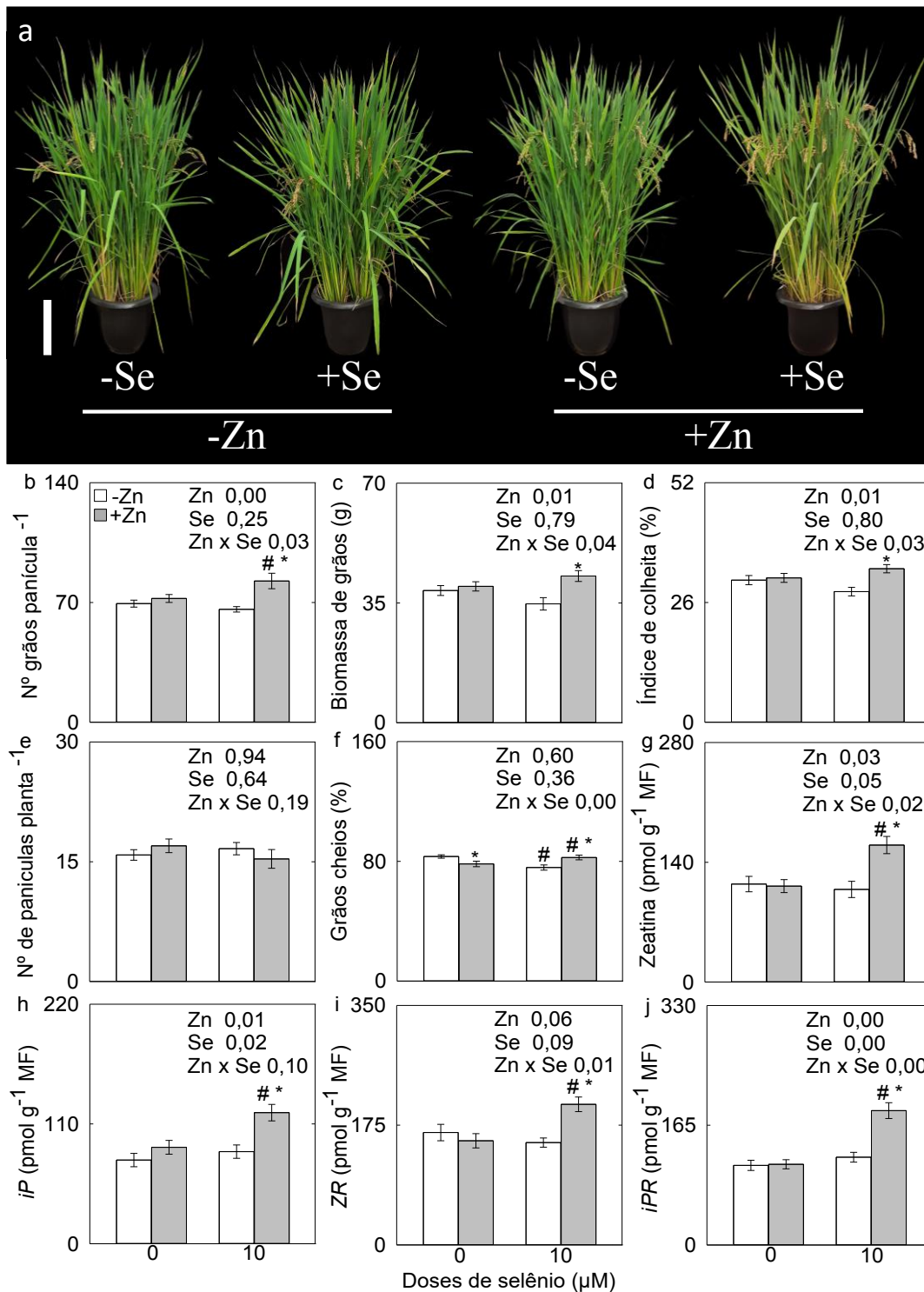


Figura 2. Efeito dos tratamentos com Se e Zn, isolados ou em combinação, na produção de grãos e no acúmulo de diferentes formas de citocinina em panículas jovens de plantas de arroz. **a.** Fenótipo das plantas aos 130 dias de cultivo. A barra de escala representa 26 cm. **b.** Número de grãos por panícula. **c.** Biomassa de grãos por planta. **d.** Índice de colheita **e.** Número de panículas por planta. **f.** Porcentagem de grãos cheios. **g.** Zeatina **h.** N⁶-isopenteniladenina **i.** Zeatina ribosídeo **j.** N⁶-isopenteniladenosina. Asteriscos representam diferença estatística entre os tratamentos com Zn dentro da mesma condição de Se. Hashtags representam diferença estatística entre os tratamentos com Se dentro da mesma condição de Zn. Teste Tukey ($P < 0,05$). Os dados são média \pm erro padrão de um experimento, com quatro repetições cada.

3.2 A absorção e o acúmulo de Zn e Se nos grãos de arroz está associada à disponibilidade de zinco no solo

Para entender o mecanismo molecular do efeito do fornecimento de Zn e Se na absorção e acúmulo de Zn e Se em plantas de arroz, analisou-se os níveis de expressão gênica dos transportadores de Zn e Se nas raízes e folhas bandeira de plantas de arroz tratadas com Zn e/ou Se. Os resultados mostraram que os níveis de expressão dos genes transportadores de nitrato de *OsNRT1.1A* e *OsNRT1.1B* foram maiores nas raízes e nas folhas bandeira das plantas tratadas com Zn, em relação as plantas não tratadas com Zn (Figuras 3a e S3). Além disso, o efeito da suplementação de Zn sobre a expressão de *OsNRT1.1A* e *OsNRT1.1B* foi independente do fornecimento de Se, já que a aplicação de Zn combinada ao Se produziu uma expressão desses genes semelhante à das plantas tratadas apenas com Zn, tanto nas raízes quanto nas folhas bandeira (Figuras 3a e S3). O tratamento das plantas de arroz com Zn não alterou a expressão de *OsSULTR1.2* e *OsNIP2.1* nos tecidos da raiz e das folhas bandeira quando comparadas as plantas não tratadas com Zn (Figura 3b, d). Entretanto, foi observado aumento significativo na abundância dos transcritos de *OsSULTR1.2* e *OsNIP2.1* nas raízes e nas folhas bandeira das plantas tratadas com Se, em relação as plantas não tratadas com Se (Figura 3b, d). O tratamento das plantas com Se elevou a expressão de *OsPT2* nas raízes e nas folhas bandeira em comparação as plantas não tratadas com Se (Figura 3c). Todavia, o tratamento das plantas com Zn não alterou significativamente a expressão de *OsPT2* nas raízes, em relação as plantas não tratadas com Zn (Figura 3c). Em contraste com as raízes, o fornecimento de Zn reduziu a expressão de *OsPT2* nas folhas bandeira das plantas tratadas com Se em relação as plantas tratadas apenas com Se (Figura 3c). Os resultados mostraram ainda que o fornecimento de Se não altera significativamente a abundância dos transcritos de *OsZIP1*, *OsZIP4*, *OsZIP6* e *OsZIP8* nas raízes e nas folhas bandeira das plantas de arroz (Figura 3e-h). Por outro lado, a suplementação das plantas com Zn elevou o nível de transcritos de *OsZIP1*, *OsZIP4*, *OsZIP6* e *OsZIP8* nas raízes e nas folhas bandeira, em relação as plantas não tratadas com Zn (Figura 3e-h).

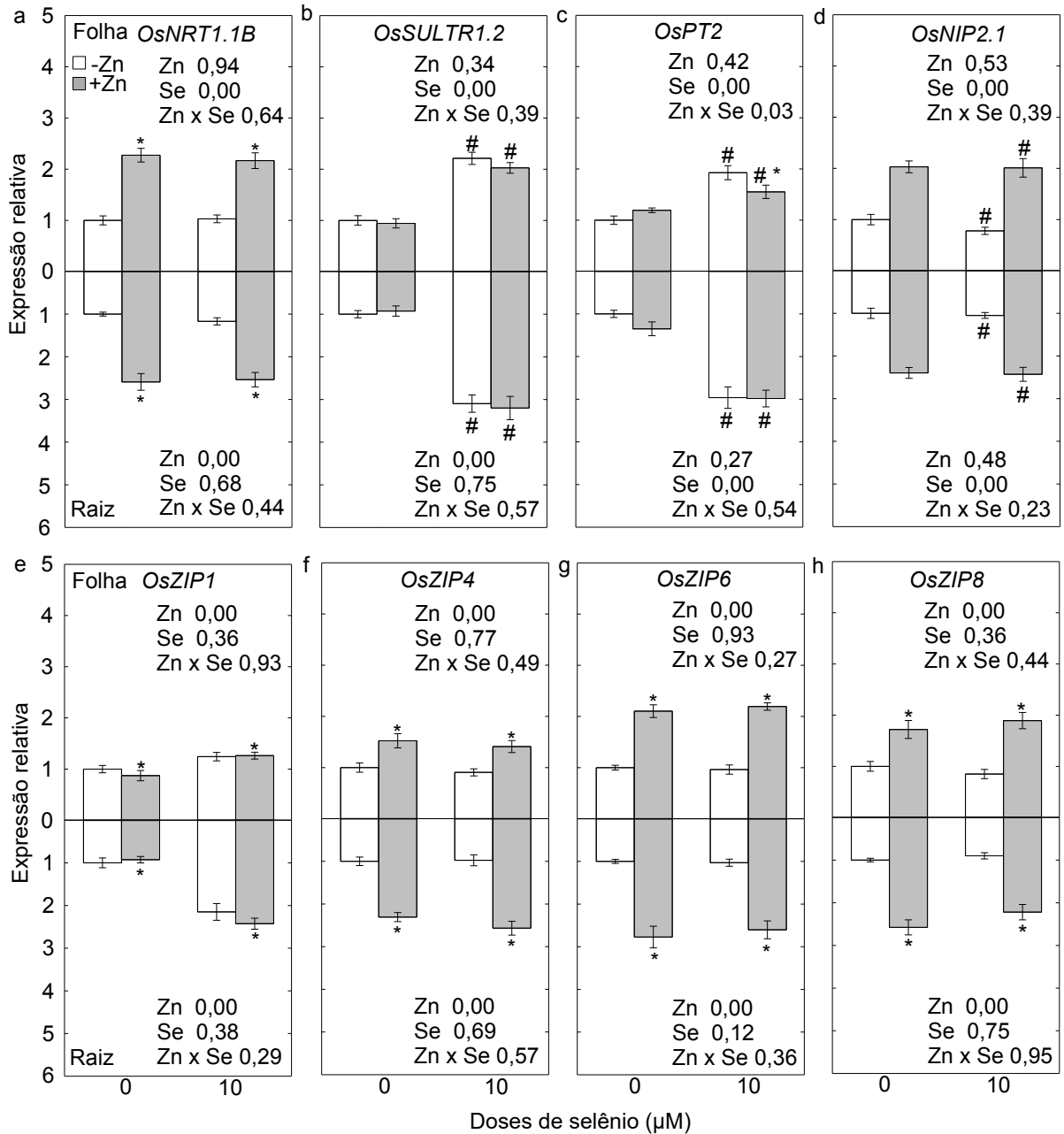


Figura 3. Efeito do Zn e do Se na expressão gênica de transportadores relacionados a absorção e transporte de Se e Zn nos tecidos da raiz e folha bandeira. **a-h.** Níveis de expressão relativa de *OsNRT1.1B*, *OsSULTR1.2*, *OsPT2*, *OsNIP2.1*, *ZIP1*, *ZIP4*, *ZIP6* e *ZIP8*, na raiz e folha bandeira. Os níveis de acúmulo de transcritos foram medidos usando primers específicos de *OsNRT1.1B*, *OsSULTR1.2*, *OsPT2*, *OsNIP2.1*, *ZIP1*, *ZIP4*, *ZIP6* e *ZIP8*, por RT-qPCR e normalizados usando ACTIN como padrão interno. Asteriscos representam diferença estatística entre os tratamentos com Zn dentro da mesma condição de Se. Hashtags representam diferença estatística entre os tratamentos com Se dentro da mesma condição de Zn. Teste Tukey ($P < 0,05$). Os dados são média \pm erro padrão de um experimento, com quatro repetições cada.

Dada as evidências de que os níveis de transcritos de *OsNRT1.1B*, *OsSULTR1.2*, *OsPT2*, *OsNIP2.1*, *ZIP1*, *ZIP4*, *ZIP6* e *ZIP8* na raiz e nas folhas bandeira afetam a absorção e o transporte de Se e Zn em plantas de arroz (Liang et al., 2019; Zhang et al., 2019; Ji et al., 2022),

analisamos o efeito da alteração da abundância de transcritos na concentração de Zn e Se nas raízes, nas folhas e nos grãos de plantas de arroz. O tratamento das plantas com Zn elevou a concentração de Zn nas raízes, folhas e grãos de arroz de forma independente do Se, pois o tratamento com Zn sozinho e em combinação com Se apresentaram valores semelhantes (Figura 4a-c). Entretanto, é interessante notar que as plantas tratadas com Se sozinho apresentaram redução na concentração de Zn nas folhas e nos grãos, mas não na raiz, em relação as plantas controle (Figura 4a-c). A concentração de Se não foi alterada nas raízes e nas folhas, mas aumentou nos grãos das plantas tratadas com Zn sozinho em relação as plantas controle (Figura 4d-f). Entretanto, o tratamento das plantas com Se sozinho elevou a concentração de Se nas raízes, nas folhas e grãos de arroz, em relação as plantas controle (Figura 4d-f). Além disso, foi observado que quando o Zn é aplicado em associação com o Se a concentração de Se nas raízes e nos grãos das plantas de arroz é superior em relação as plantas tratadas com Se ou Zn sozinhos (Figura 4d-f).

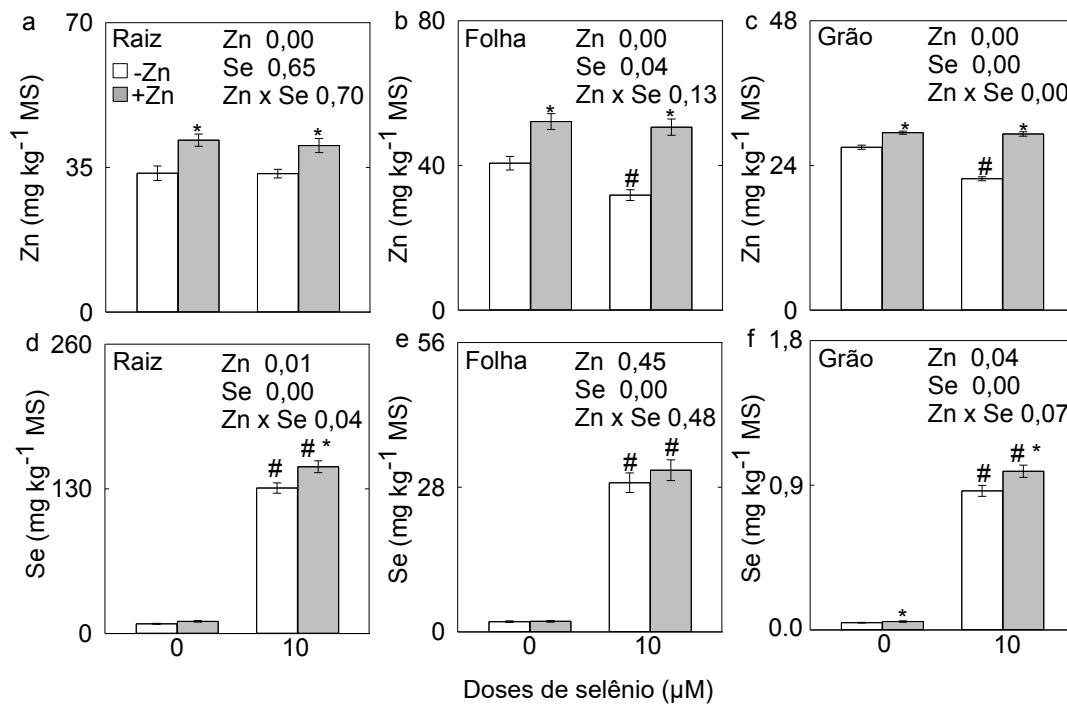


Figura 4. Efeito dos tratamentos com Se e Zn, isolados ou em combinação, no acúmulo de zinco e selênio em diferentes órgãos de plantas de arroz. **a.** Concentração de zinco na raiz **b.** Concentração de zinco nas folhas **c.** Concentração de zinco nos grãos **d.** Concentração de selênio na raiz **e.** Concentração de selênio nas folhas **f.** Concentração de selênio nos grãos. Asteriscos representam diferença estatística entre os tratamentos com Zn dentro da mesma condição de Se. Hashtags representam diferença estatística entre os tratamentos com Se dentro da mesma condição de Zn. Teste Tukey ($P < 0,05$). Os dados são média \pm erro padrão de um experimento, com quatro repetições cada.

3.3 O Se afeta o acúmulo de minerais e produtos de reserva nos grãos em resposta ao fornecimento de Zn

O fornecimento de Zn não alterou a concentração de N, Mg, S e Ca nos grãos das plantas de arroz em relação as plantas não tratadas com Zn (Figura 5a-d). Entretanto, um significativo incremento nas concentrações de N, Mg, S e Ca foi observado nos grãos das plantas tratadas com Se, quando comparados aos grãos das plantas não tratadas com Se (Figura 5a-d). O tratamento com Zn aumentou a concentração de P nos grãos em relação aos grãos das plantas não tratadas com Zn (Figura 5e). Entretanto, o tratamento das plantas com Se não alterou a concentração de P nos grãos das plantas de arroz (Figura 5e). Não houve diferença nas concentrações de K entre os tratamentos (Figura 5f). Os resultados mostraram também que as plantas suplementadas com Se apresentaram maior concentração de Fe nos grãos em relação as plantas não tratadas com Se (Figura 5g). É interessante notar que embora a aplicação de Zn ou Se não tenha alterado de forma significativa a concentração de Cu e Mn nos grãos, a concentração de Cu nos grãos das plantas tratadas com Se e Zn em combinação tendem a ser maior que nos demais tratamentos (Figura S4). Em contrapartida, a concentração de Mn nos grãos das plantas tratadas com Zn e Se em combinação apresentam uma redução em relação aos demais tratamentos (Figura S4). Não houve diferença nas concentrações de B entre os tratamentos (Figura S4). A concentração de P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu nas raízes das plantas de arroz não diferiram entre os tratamentos (Figura S5).

De maneira geral, a concentração de albumina nos grãos não foi afetada pelo fornecimento de Zn ou Se às plantas de arroz (Figura 5h). A concentração de prolamina nos grãos das plantas tratadas com Se foi maior do que nos grãos das plantas não tratadas com Se (Figura 5i). Entretanto, não foi observado efeito significativo da aplicação de Zn sobre a concentração de prolamina nos grãos (Figura 5i). A concentração de globulina e de glutelina nos grãos das plantas tratadas com Se ou Zn sozinhos foi maior do que nos grãos das plantas controle (Figura 5j,k). Os resultados revelam ainda que as plantas tratadas com Se e Zn em combinação apresentaram maior concentração de globulina e glutelina nos grãos do que as plantas tratadas com Zn ou Se sozinhos (Figura 5j, k). A concentração de proteínas totais nos grãos das plantas tratadas com Se ou Zn sozinhos foi maior do que nos grãos das plantas controle (Figura 5l). Adicionalmente, a concentração de proteínas totais nos grãos das plantas tratadas com Zn e Se em combinação aumentou 33,5% em relação as plantas tratadas apenas com Zn e 11% em relação as plantas tratadas somente com Se (Figura 5l). Não foram

observadas diferenças significativas na concentração de aminoácidos totais, açúcares solúveis e amido nos grãos de arroz entre os diferentes tratamentos (Figura S4).

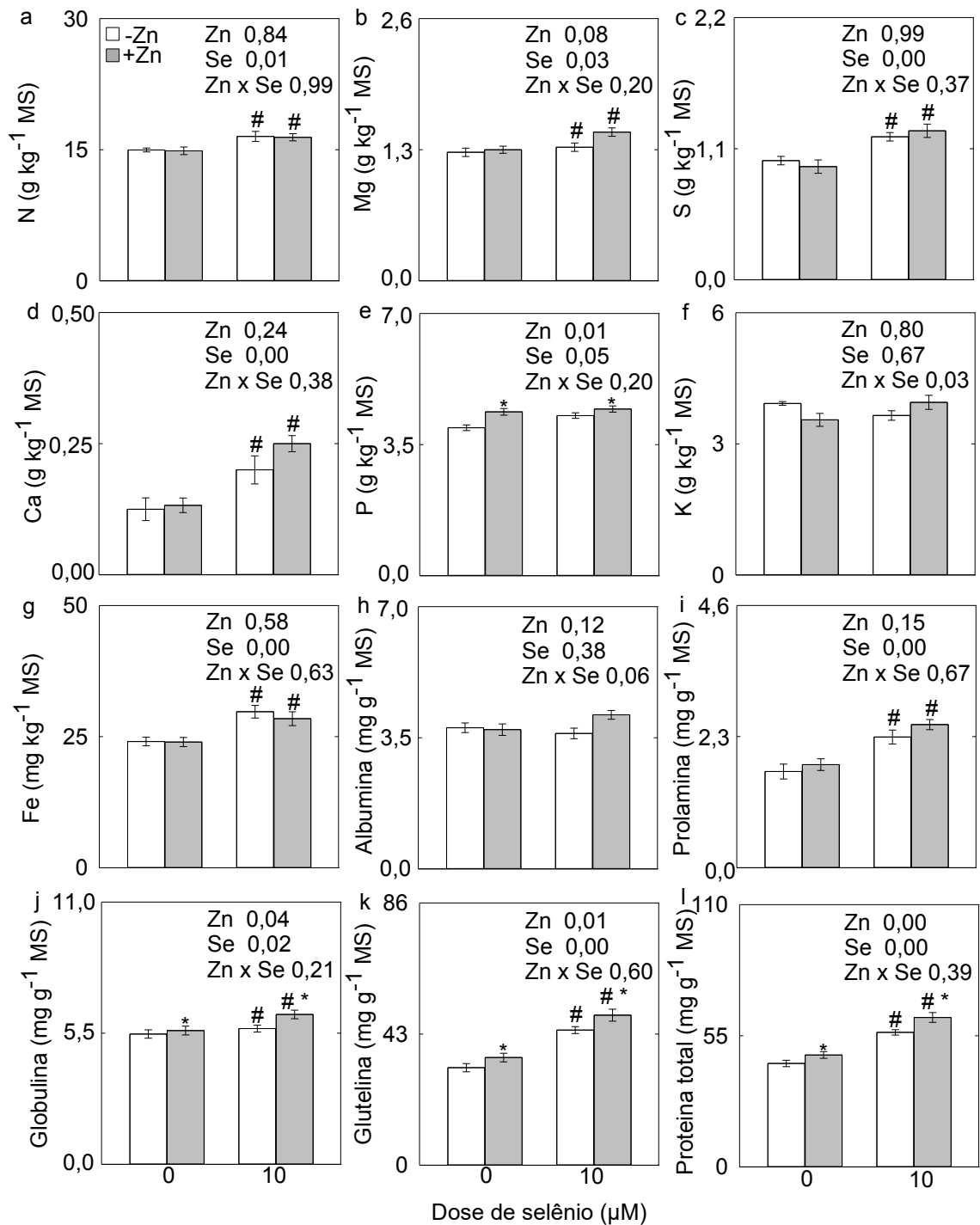


Figura 5. Alterações na composição mineral e de proteínas nos grãos de plantas de arroz tratadas com Se e Zn. **a.** Nitrogênio. **b.** Magnésio. **c.** Enxofre. **d.** Cálcio. **e.** Fósforo. **f.** Potássio. **g.** Ferro. **h.** Albumina. **i.** Prolamina. **j.** Globulina. **k.** Glutelina. **l.** Proteínas Totais. Asteriscos representam diferença estatística entre os tratamentos com Zn dentro da mesma condição de Se. Hashtags representam diferença estatística entre os tratamentos com Se dentro da mesma condição de Zn. Teste Tukey ($P < 0,05$). Os dados são média \pm erro padrão de um experimento, com quatro repetições cada.

4 DISCUSSÃO

A disponibilidade de nutrientes nos solos dos campos de produção sofre uma considerável flutuação durante a estação de crescimento das plantas (Gao et al., 2019). Neste contexto, as plantas desencadeiam uma série de respostas fisiológicas e hormonais para adaptar o seu crescimento e desenvolvimento às mudanças na disponibilidade de nutrientes (Gao et al., 2019). O fornecimento de Zn regula positivamente a biossíntese de citocininas em arroz (Gao et al., 2019; Cao et al., 2022). As citocininas estimulam o crescimento da parte aérea de plantas de arroz (Li et al., 2013), ao passo que inibem o crescimento radicular (Rivas et al., 2022). De fato, no presente estudo foi observado uma redução na razão raiz/parte aérea e na biomassa de raízes, ao passo que a concentração de zeatina, *iP*, *ZR* e *iPR* aumentou nas raízes das plantas de arroz tratadas com Zn sozinho, em relação as plantas do controle (Figura 1). Entretanto, o Se recuperou parcialmente a biomassa das raízes das plantas tratadas com Zn (Figura 1). No presente estudo, a aplicação de Se nas plantas tratadas com Zn reduziu a concentração de zeatina, *iP*, *ZR* e *iPR* nas raízes, em relação as plantas tratadas apenas com Zn, aliviando a repressão do crescimento da raiz mediado pelo Zn (Figura 1). Além disso, o Se, em baixas concentrações, estimula a biossíntese de auxina em tabaco, remodelando a arquitetura do sistema radicular e aumentando a biomassa de raízes (Jia et al., 2018). Dessa forma, é possível que o Se também esteja atuando alterando a razão auxina/citocinina no sistema radicular. Entretanto, análises complementares são necessárias para entender melhor a forma com qual o Zn e o Se interagem com as vias hormonais em plantas de arroz.

A aplicação de Zn alterou os níveis de transcritos na raiz dos parálogos de CYP735A, que participam da biossíntese de citocininas em plantas (Wu et al., 2017; Gao et al., 2019), mas não alterou a expressão desses genes nas folhas bandeira (Figuras 1 e 2). Além disso, foi observado que a aplicação de Se aumentou substancialmente as concentrações de zeatina, *iP*, *ZR* e *iPR* nas panículas das plantas tratadas com Zn. Entretanto, o acúmulo de citocininas na parte aérea é determinado pelo transporte das citocininas sintetizadas na raiz e é essencial para o rendimento de grãos da cultura do arroz (Wu et al., 2017; Zhao et al., 2019). Adicionalmente, foi relatado que a aplicação de Se no meio de cultivo pode alterar o transporte de citocinina da raiz para a parte aérea em plantas de *Arabidopsis* (Lehotai et al., 2016). Dessa forma, o acúmulo de citocininas na panícula e sua eliminação parcial das raízes das plantas tratadas com Zn e Se em combinação, sugere um aumento na translocação das citocininas da raiz para a parte aérea induzida como efeito da aplicação de Se. Neste contexto, os principais componentes que determinam o rendimento de grãos de arroz, como o número de panículas por planta, número

de grãos por panícula e peso de grãos (Li et al., 2013), foram aumentados nas plantas tratadas com Zn e Se em combinação, mas não nas plantas tratadas apenas com Zn. Em conjunto esses resultados indicam que o Se pode modular a ação das citocininas nas plantas de arroz de forma diferencial, amenizando os efeitos negativos das citocininas no sistema radicular e incrementando a produção de grãos. Tendo em vista que a deficiência de Zn é um distúrbio generalizado em arrozais, um equilíbrio entre a fertilização com Zn e Se precisa ser alcançado para melhorar a produção de grãos bem como a qualidade nutricional dos grãos de arroz.

Em plantas de arroz, os genes que codificam transportadores de nitrato, *NRT1.1A* e *NRT1.1B* (Figuras 3 e S3), são positivamente regulados pelo fornecimento de Zn (Ji et al., 2022). *NRT1.1B*, por sua vez, apresenta atividade de transporte de Se da raiz para a parte aérea, melhorando a concentração de Se nos grãos de arroz (Zhang et al., 2019). No entanto, a atuação de *NRT1.1B* coordenada pelo Zn e sua interação com Se é pouco conhecida, principalmente durante o estágio reprodutivo de plantas de arroz. Neste estudo, a aplicação de Zn elevou a expressão de *OsNRT1.1B* nas raízes e nas folhas bandeira (Figura 3), provavelmente aumentando o transporte de Se da raiz para os grãos de arroz (Zhang et al., 2019; Teixeira et al., 2021). Consequentemente, a concentração de Se nas raízes e nos grãos das plantas de arroz tratadas com Se aumentou de forma dependente do fornecimento de Zn (Figura 4). Estes resultados sugerem que o aumento na concentração de Se nos grãos mediado por *OsNRT1.1B* é dependente da disponibilidade de Zn no solo. A absorção de Se pelas raízes das plantas de arroz é mediada por vários transportadores de elementos iônicos (Liang et al., 2019). Aqui, a aplicação de Se elevou a expressão de *OsSULTR1.2*, *OsPT2* e *OsNIP2.1* nas raízes das plantas de arroz independente da disponibilidade de Zn no solo (Figuras 3 e 4), contribuindo para o aumento da assimilação e absorção de Se pelas raízes (Su et al., 2023). O fornecimento de selenato às plantas imita a deficiência de enxofre e induz a expressão de genes que codificam transportadores de enxofre, como os *OsSULTR1.1* e *OsSULTR1.2* (Cardoso et al., 2023), melhorando a concentração de Se nas raízes e na parte aérea (Figura 4). Adicionalmente, o Se regulou positivamente a expressão de *OsSULTR1.2*, *OsPT2* e *OsNIP2.1* nas folhas bandeira, que desempenham um papel crucial na biofortificação das sementes (Krishna et al., 2020). Juntos, esses resultados sugerem que o Zn é necessário para o acúmulo de Se nos grãos, mas que a absorção não está necessariamente ligada ao aumento do transporte de Se.

No presente estudo, a adição de Zn elevou a expressão de *OsZIP1*, *OsZIP4*, *OsZIP6* e *OsZIP8* nas raízes e nas folhas bandeira de arroz de forma independente da aplicação de Se (Figura 3). Os transportadores da família ZIP são a rota primária para a absorção, transporte e distribuição de Zn em plantas de arroz (Gao et al., 2019; Krishna et al., 2023). O aumento na

expressão dos transportadores de Zn está associado a elevação da concentração de Zn nos grãos (Ji et al., 2022). De fato, a concentração de Zn aumentou nas raízes, nas folhas e nos grãos em resposta ao tratamento com Zn, combinado ou não ao Se (Figura 4). Entretanto, foi observado que o tratamento das plantas com Se isoladamente, reduziu a concentração de Zn nas folhas e nos grãos de arroz (Figura 4), como observado em estudo anterior com arroz (Teixeira et al., 2021). O arroz é uma das culturas básicas para cerca de metade da população mundial, fornecendo micronutrientes essenciais para a saúde humana (Ramos et al., 2022). Entretanto, os grãos de arroz são naturalmente pobres em Zn e Se (Mangueze et al., 2018). Segundo a WHO/FAO (2004) a ingestão diária recomendada de Se é de 55-400µg/dia e a de Zn é de 8-45mg/dia. Considerando um consumo médio por pessoa de 180g de arroz por dia, os grãos provenientes das plantas tratadas com Se e Zn em combinação, forneceriam uma concentração de Se dentro da faixa adequada e cerca de 60% da ingestão recomendada de Zn.

O Se e o Zn podem afetar a concentração de outros minerais importantes nos grãos de arroz (Boldrin et al. 2013; Mangueze et al., 2018; Teixeira et al., 2021). Teixeira et al. (2021), por exemplo, observaram que a aplicação de Se reduzia as concentrações de Fe, Mn, Cu e Zn, mas aumentava a concentração de Mo e Mg com o aumento da disponibilidade de N. Entretanto, na configuração experimental deste estudo, o Se aumentou a concentração de N, S, Mg, Ca e Fe nos grãos de forma independente ao fornecimento de Zn, quando comparados as plantas não tratadas com Se (Figura 5). Esse aumento está correlacionado ao aumento de N, S, Ca e Fe nas folhas bandeira (Figura S6), que desempenha papel direto na entrega de minerais para os grãos de arroz (Li et al., 2023). Dessa forma, a aplicação de Se teve efeito sobre minerais que se movem por difusão, como o Fe, e também aqueles que se movem por fluxo de massa como N, S, Mg e Ca (Alaoui et al., 2022). O aumento na concentração desses minerais nos grãos pode estar associado ao aumento da taxa transpiratória promovida pelo tratamento com Se (Figura S1), visto que a transpiração é a principal força que impulsiona o transporte de elementos minerais das raízes para a parte aérea (Deng et al., 2022). Segundo Murphy et al. (2008), a concentração de minerais nos grãos pode ser reduzida quando a produção de grãos é aumentada, o que configura o efeito da diluição de minerais. Aqui, foi observado que as plantas tratadas com Se em associação com o Zn apresentaram maior biomassa de grãos (Figura 2), o que ocorreu concomitantemente a elevação de N, S, Mg, Ca e Fe nos grãos (Figura 5). Estes resultados indicam que o efeito de diluição parece não ser um fator que afeta a concentração de N, S, Mg, Ca e Fe nos grãos.

As proteínas de reserva representam o principal dreno de Zn e outros metais no endosperma de cereais (Gao et al., 2022). Neste sentido, as proteínas de reserva são as principais

responsáveis pelo armazenamento de Se e Zn nas sementes de arroz, contribuindo significativamente para a qualidade nutricional dos grãos (Hu et al., 2018; Saleh et al., 2019; Gao et al., 2022). Além disso, o Se depende principalmente de selenoproteínas para desempenhar suas funções em humanos (Zhang e Chu, 2022). No presente estudo, o Se aumentou a concentração de prolamina nos grãos de forma independente ao fornecimento de Zn (Figura 5). Entretanto, o efeito do Se no acúmulo de globulina, glutelina e proteínas totais nos grãos de arroz foi dependente do fornecimento de Zn (Figura 5). O Zn tem efeito positivo no conteúdo de proteínas em cereais (Nahar et al., 2020; Gao et al., 2022) e parece ser necessário para a resposta completa ao Se para o acúmulo de proteínas nos grãos de arroz. Dado que a glutelina e a globulina correspondem a maior porção de proteínas de reserva em arroz (Reis et al., 2020; Gao et al., 2022), esses resultados sugerem que a proporção entre as proteínas de reserva é modulada pelo efeito combinado do Se ao fornecimento de Zn.

5 CONCLUSÃO

O Se reverte parcialmente os efeitos negativos do aumento da concentração de citocininas no sistema radicular nas plantas tratadas com Zn, ao passo que melhora o rendimento de grãos em função do acúmulo de citocininas nas panículas do arroz (Figura 6). O aumento da expressão de *NRT1.1B*, que codifica um transportador de nitrato que também transporta Se, nas raízes e folhas bandeira das plantas de arroz supridas com Zn favorece o acúmulo de Se nas folhas bandeira e grãos de arroz. Além disso, o fornecimento de Se às plantas aumenta a capacidade de absorção de Se pela raiz e o acúmulo de Se nos grãos em função do aumento da abundância de transcritos de *OsSULTR1.2*, *OsPT2* e *OsNIP2.1* na raiz e nas folhas bandeira (Figura 6). O fornecimento de Zn eleva a abundância de transcritos de *OsZIP1*, *OsZIP4*, *OsZIP6* e *OsZIP8* nas raízes e nas folhas bandeira de arroz de forma independente do Se, e favorece a absorção e o acúmulo de Zn nos grãos de arroz (Figura 6). A suplementação das plantas com Se melhora a concentração de proteínas nos grãos em resposta a disponibilidade de Zn (Figura 6). Além disso, a suplementação das plantas de arroz com Se eleva a concentração de N, S, Mg, Ca, Fe e Cu nos grãos de forma independente ao fornecimento de Zn. Em resumo, o Se e o Zn agem de forma sinérgica para melhorar a composição nutricional e o rendimento de grãos de arroz japônica.

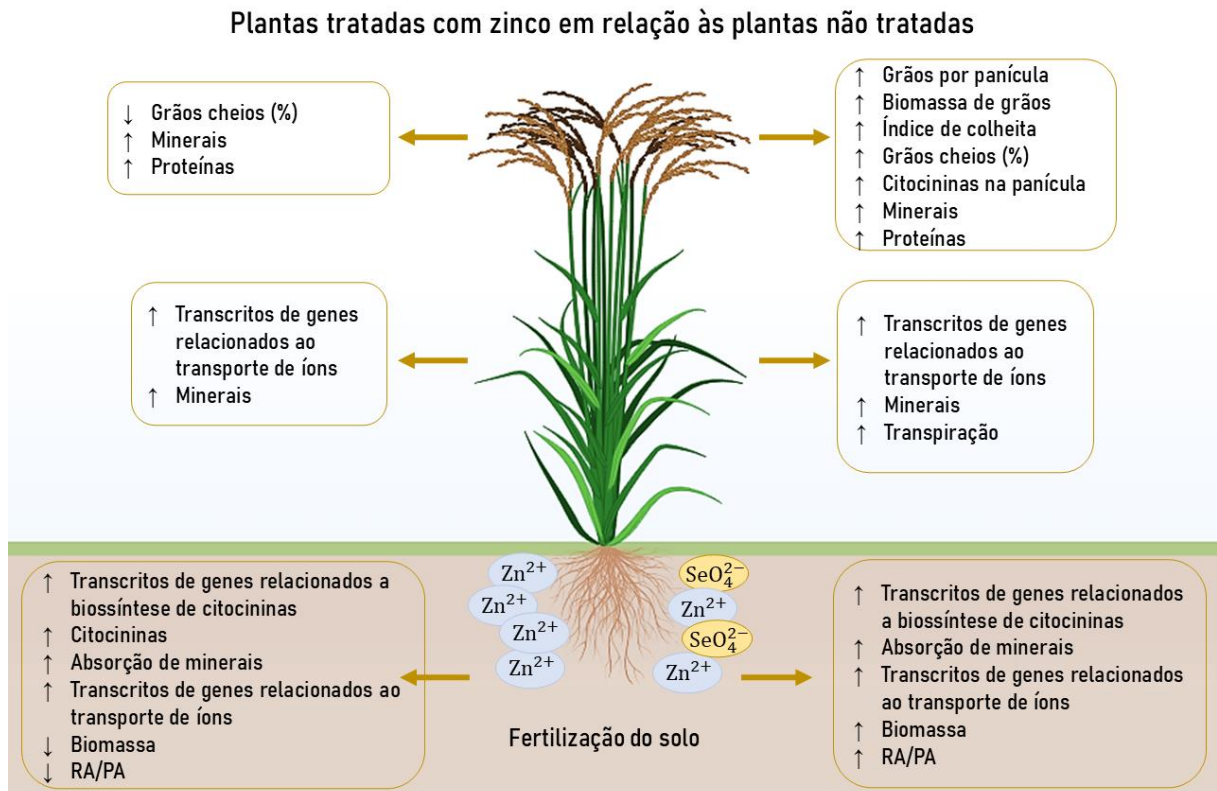


Figura 6. Visão geral das respostas das plantas de arroz ao Se na presença da fertilização com Zn em relação a não fertilização. A combinação do Se com o Zn resultou em ganhos quantitativos no rendimento de grãos em relação as plantas não tratadas com Se, devido ao aumento da concentração de citocininas na panícula dessas plantas. Além disso, o aumento da concentração de citocininas nas plantas tratadas com Zn reduziu a biomassa de raízes. Entretanto, a adição de Se reverteu parcialmente esse efeito. Adicionalmente, a aplicação de Zn e Se, sozinhos ou em combinação, regulou positivamente o acúmulo de proteínas nos grãos quando comparadas as plantas controle. Observa-se ainda que a aplicação de Zn e Se, sozinhos ou em combinação, regulou positivamente o acúmulo de minerais nos grãos em função do aumento na abundância de transcritos de transportadores de genes relacionados ao transporte de íons.

REFERÊNCIAS

- Alam, A. M.; Vemuri, H.; Hossain, A.; Syed, A. M.; Alam, K. M.; Islam, R. M. (2020). Biofortification of iron, zinc, and selenium in rice for better quality. Em: Rice Research for Quality Improvement: Genomics and Genetic Engineering. Singapore: Springer Singapore, 2020. p. 669–686. https://doi.org/10.1007/978-981-15-5337-0_30.
- Alaoui, I.; El Ghadraoui, O.; Serbouti, S.; Ahmed, H.; Mansouri, I.; El Kamari, F.; Taroq, A.; Ousaaïd, D.; Squalli, W.; Farah, A. The Mechanisms of Absorption and Nutrients Transport in Plants: A Review. *Tropical Journal of Natural Product Research*, v. 6, p. 8–14, 2022. <https://doi.org/10.26538/tjnpr/v6i1.2>
- Andrade, F.; Silva, G. N.; Guimarães, K. C.; Barreto, H. B. F.; Souza, K. R. D.; Guilherme, L. R. G.; Faquin, V.; Reis, A. R. Selenium protects rice plants from water deficit stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 164, p. 562-570, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.08.022>.
- Avery, J. C.; Hoffmann, P. R. Selenium, Selenoproteins, and Immunity. *Nutrients*, v. 10, e1203, 2018. <https://doi.org/10.3390/nu10091203>.
- Boldrin, P. F.; Faquin, V.; Ramos, S. J.; Boldrin, K. V. F.; Ávila, F. W.; Guilherme, L. R. G. Soil and foliar application of selenium in rice biofortification. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 31, p. 238-244, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.06.002>
- Cao, H. W.; Li, C.; Zhang, B. Q.; Rono, J. K.; Yang, Z. M. A metallochaperone HIPP33 is required for rice zinc and iron homeostasis and productivity. *Agronomy*, v. 12, p. 469-488, 2022. <https://doi.org/10.3390/agronomy12020488>.
- Cardoso, A. A. S.; Namorato, F. A.; Guilherme, L. R. G.; Silva, M. L. S.; Liu, J.; Li, L. Glutathione is involved in selenium detoxification and suppresses the selenate-induced *SULTR1;1* gene expression in plants. *Environmental and Experimental Botany*, v. 213, e105424, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2023.105424>
- Cross, J. M.; von Korff, M.; Altmann, T.; Bartzetko, L.; Sulpice, R.; Gibon, Y.; Palacios, N.; Stitt, M. Variation of enzyme activities and metabolite levels in 24 Arabidopsis accessions growing in carbon-limited conditions. *Plant Physiology*, v. 142, p. 1574–1588, 2006. <https://doi.org/10.1104/pp.106.086629>.
- Deng, B.; Zhang, W.; Yang, H. Abscisic Acid Decreases Cell Death in *Malus hupehensis* Rehd. Under Cd Stress by Reducing Root Cd²⁺ Influx and Leaf Transpiration. *Journal of Plant Growth Regulation*, v. 41, p. 639-646, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00344-021-10327-0>.
- Ei, H. H.; Zheng, T.; Farooq, M. U.; Zeng, R.; Su, Y.; Zhang, Y.; Liang, Y.; Tang, Z.; Ye, X.; Jia, X.; Zhu, J. Impact of selenium, zinc and their interaction on key enzymes, grain yield, selenium, zinc concentrations, and seedling vigor of biofortified rice. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 27, p. 16940–16949, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08202-8>.

- El Mehdawi, A. F.; Jiang, Y.; Guignardi, Z. S.; Esmat, A.; Pilon, M.; Pilon-Smits, E. A. H.; Schiavon, M. Influence of sulfate supply on selenium uptake dynamics and expression of sulfate/selenate transporters in selenium hyperaccumulator and non-hyperaccumulator Brassicaceae. *New Phytologist*, v. 217, p. 194–205, 2018. <https://doi.org/10.1111/nph.14838>.
- Fang, Y.; Wang, L.; Xin, Z.; Zhao, L.; An, X.; Hu, Q. Effect of foliar application of zinc, selenium, and iron fertilizers on nutrients concentration and yield of rice grain in China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, p. 2079–2084, 2008. <https://doi.org/10.1021/jf800150z>.
- Gao, S.; Xiao, Y.; Xu, F.; Gao, X.; Cao, S.; Zhang, F.; Wang, G.; Sanders, D.; Chu, C. Cytokinin-dependent regulatory module underlies the maintenance of zinc nutrition in rice. *New Phytologist*, v. 224, p. 202–215, 2019. <https://doi.org/10.1111/nph.15962>.
- Gao, Y.; Persson, D. P.; Vincze, E.; Schjoerring, J. K. Modification of storage proteins in the barley grain increases endosperm zinc and iron under both normal and elevated atmospheric CO₂. *Physiologia Plantarum*, v. 174, e13624, 2022. <https://doi.org/10.1111/ppl.13624>.
- Gupta, M.; Gupta, S. An overview of selenium uptake, metabolism, and toxicity in plants. *Frontiers in Plant Science*, v. 7, e2074, 2017. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016>.
- Hu, Z.; Cheng, Y.; Suzuki, N.; Guo, X.; Xiong, H.; Ogra, Y. Speciation of Selenium in Brown Rice Fertilized with Selenite and Effects of Selenium Fertilization on Rice Proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, e3494, 2018. <https://doi.org/10.3390/ijms19113494>
- Ji, C.; Li, J.; Jiang, C.; Zhang, L.; Shi, L.; Xu, F.; Cai, H. Zinc and nitrogen synergistic act on root-to-shoot translocation and preferential distribution in rice. *Journal of Advanced Research*, v. 35, p. 187–198, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.04.005>.
- Jia, H.; Song, Z.; Wu, F.; Li, Y.; Han, D.; Yang, Y.; Zhan, S.; Cui, H. Low selenium increases the auxin concentration and enhances tolerance to low phosphorous stress in tobacco. *Environmental and Experimental Botany*, v. 153, p. 127–134, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.05.017>.
- Jones, G. D.; Droz, B.; Greve, P.; Gottschalk, P.; Poffet, D.; McGrath, S. P.; Seneviratne, S. I.; Smith, P.; Winkel, L. H. Selenium deficiency risk predicted to increase under future climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 114, p. 2848–2853, 2017. <https://doi.org/10.1073/pnas.1611576114>.
- Kawakami, Y.; Bhullar, N. K. Molecular processes in iron and zinc homeostasis and their modulation for biofortification in rice. *Journal of Integrative Plant Biology*, v. 60, p. 1181–1198, 2018. <https://doi.org/10.1111/jipb.12751>.
- Krishna, T. P. A.; Maharajan, T.; Ceasar, S. A. The Role of Membrane Transporters in the Biofortification of Zinc and Iron in Plants. *Biological Trace Element Research*, v. 201, p. 464–478, 2023. <https://doi.org/10.1007/s12011-022-03159-w>.

- Krishna, T. P. A.; Maharajan, T.; Roch, G. V.; Ignacimuthu, S.; Ceasar, S. A. Structure, function, regulation and phylogenetic relationship of ZIP family transporters of plants. *Frontiers in Plant Science*, v. 11, p. 662, 2020. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00662>.
- Lehotai, N.; Feigl, G.; Koós, Á.; Molnár, Á.; Ördög, A.; Petó, A.; Erdei, L.; Kolbert, Z. Nitric oxide–cytokinin interplay influences selenite sensitivity in *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports*, v. 35, p. 2181–95, 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s00299-016-2028-5>.
- Li, J.; Liu, Y.; Kong, L.; Xu, E.; Zou, Y.; Zhang, P.; Zhang, W.; Chen, X. An intracellular transporter OsNRAMP7 is required for distribution and accumulation of iron into rice grains. *Plant Science*, 336, e11183, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2023.111831>.
- Li, S.; Zhao, B.; Yuan, D.; Duan, M.; Qian, Q.; Tang, L.; Wang, B.; Liu, X.; Zhang, J.; Wang, J.; Sun, J.; Liu, Z.; Feng, Y. Q.; Yuan, L.; Li, C. Rice zinc finger protein DST enhances grain production through controlling Gnl1a/OsCKX2 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 110, p. 3167-3172, 2013. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300359110>.
- Liang, Y.; Su, Y.; Li, L.; Huang, X.; Panhwar, F. H.; Zheng, T.; Tang, Z.; Ei, H. H.; Farooq, M. U.; Zeng, R.; Zhang, Y.; Ye, X.; Jia, X.; Zheng, L.; Zhu, J. Quick selenium accumulation in the selenium-rich rice and its physiological responses in changing selenium environments. *BMC Plant Biology*, v. 19, p. 559, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2163-6>.
- Lidon, F. C.; Oliveira, K.; Galhano, C.; Guerra, M.; Ribeiro, M. M.; Pelica, J.; Pataco, I.; Ramalho, J. C.; Leitão, A. E.; Almeida, A. S.; Campos, O. S.; Ribeiro-Barros, A. I.; Pais, I. P.; Silva, M. M.; Carvalho, M. L.; Santos, J. P.; Pessoa, M. F.; Reboredo, F. H. Selenium biofortification of rice through foliar application with selenite and selenate. *Experimental Agriculture*, v. 55, p. 528-542, 2009. <https://doi.org/10.1017/S0014479718000157>.
- Lima, L. W.; Pilon-Smits, E. A. H.; Schiavon, M. Mechanisms of selenium hyperaccumulation in plants: A survey of molecular, biochemical and ecological cues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1862, p. 2343-2353, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.03.028>.
- Liu, X.; Feng, S.; Zhang, B.; Wang, M.; Cao, H.; Rono, J. K.; Chen, X.; Yang, Z. OsZIP1 functions as a metal efflux transporter limiting excess zinc, copper and cadmium accumulation in rice. *BMC Plant Biology*, v. 19, p. 1-16, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1899-3>.
- Liu, X.; Huang, Z.; Li, Y.; Xie, W.; Li, W.; Tang, X.; Ashraf, U.; Kong, L.; Wu, L.; Wang, S.; Mo, Z. Selenium-silicon (Se-Si) induced modulations in physio-biochemical responses, grain yield, quality, aroma formation and lodging in fragrant rice. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 196, e110525, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110525>.
- Longchamp, M.; Castrec-Rouelle, M.; Biron, P.; Bariac, T. Variations in the accumulation, localization and rate of metabolization of selenium in mature *Zea mays* plants supplied

- with selenite or selenate. *Food Chemistry*, v. 182, p. 128-135, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.137>.
- Malheiros, R. S. P.; Costa, L. C.; Ávila, R. T.; Pimenta, T. M.; Teixeira, L. S.; Brito, F. A. L.; Zsögön, A.; Araújo, W. L.; Ribeiro, D. M. Selenium downregulates auxin and ethylene biosynthesis in rice seedlings to modify primary metabolism and root architecture. *Planta*, v. 250, p. 333-345, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03175-6>.
- Malheiros, R. S. P.; Gonçalves, F. C. M.; Brito, F. A. L.; Zsögön, A.; Ribeiro, D. M. Selenomethionine induces oxidative stress and modifies growth in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings through effects on hormone biosynthesis and primary metabolism. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 189, e109942, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109942>.
- Manguenze, A. V. J.; Pessoa, M. F. G.; Silva, M. J.; Ndayiragije, A.; Magaia, H. E.; Cossa, V. S. I.; Reboredo, F. H.; Carvalho, M. L.; Santos, J. P.; Guerra, M.; Ribeiro-Barros, A. I.; Lidon, F. C.; Ramalho, J. C. Simultaneous Zinc and selenium biofortification in rice. Accumulation, localization and implications on the overall mineral content of the flour. *Journal of Cereal Science*, v. 82, p. 34-41, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2018.05.005>.
- Menguer, P. K.; Vincent, T.; Miller, A. J.; Brown, J. K. M.; Vincze, E.; Borg, S.; Holm, P. B.; Sanders, D.; Podar, D. Improving zinc accumulation in cereal endosperm using HvMTP1, a transition metal transporter. *Plant Biotechnology Journal*, 16, 63-71, 2018.
- Muñoz-Huerta, R. F.; Guevara-Gonzalez, R. G.; Contreras-Medina, L. M.; Torres-Pacheco, I.; Prado-Olivarez, J.; Ocampo-Velazquez, R. V. A review of methods for sensing the nitrogen status in plants: advantages, disadvantages and recent advances. *Sensors*, v. 13, p. 10823–10843, 2013. <https://doi.org/10.3390/s130810823>.
- Murphy, K. M.; Reeves, P. G.; Jones, S. S. Relationship between yield and mineral nutrient concentrations in historical and modern spring wheat cultivars. *Euphytica*, v. 163, p. 381-390, 2008. <https://doi.org/10.1007/s10681-008-9681-x>.
- Nahar, K.; Jahiruddin, M.; Islam, M. R.; Khatun, S.; Roknuzzaman, M.; Sultan, M. T. Biofortification of rice grain as affected by different doses of zinc fertilization. *Asian Soil Research Journal*, v. 3, p. 1-6, 2020. <https://doi.org/10.1111/pbi.12749>.
- Peleg, Z.; Reguera, M.; Tumimbang, E.; Walia, H.; Blumwald, E. Cytokinin-mediated source/sink modifications improve drought tolerance and increase grain yield in rice under water-stress. *Plant Biotechnology Journal*, v. 7, p. 747-758, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2010.00584.x>.
- Prauchner, C. A. (2014). A importância do selênio para a agropecuária e saúde humana. Santa Maria: Editora da UFSM. 376 p.
- Ramos, D. P.; Chan, G. A. H.; Tavares, T. C. O.; Santos, M. M.; Sousa, S. A.; Soares, G. M.; Veloso, D. A.; Souza, W. R.; Oliveira, A. C. F.; Veloso, N. M.; Fernandes, V. S.; Macena Jr, N. R.; Jorge, V. S.; Fidelis, R. R. Impacts of Selenium Foliar Biofortification on the Biochemical Composition and Grain Yield of Rice Cultivars. *American Academic*

Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences, v. 88, p. 1–14, 2022.

https://asrjetsjournal.org/index.php/American_Scientific_Journal/article/view/7580.

- Reis, H. P. G.; Barcelos, J. P. Q.; Silva, V. M.; Santos, E. F.; Tavanti, R. F. R.; Putti, F. F.; Young, S. D.; Broadley, M. R.; White, P. J.; dos Reis, A. R. Agronomic biofortification with selenium impacts storage proteins in grains of upland rice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 100, p. 1990–1997, 2020. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10212>.
- Rivas, M. Á.; Friero, I.; Alarcón, M. V.; Salguero, J. Auxin-cytokinin balance shapes maize root architecture by controlling primary root elongation and lateral root development. *Frontiers in Plant Science*, v. 13, e836592, 2022. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.836592>.
- Roda, F. A.; Marques, I.; Batista-Santos, P.; Esquível, M. G.; Ndayiragije, A.; Lidon, F. C.; Swamy, B. P. M.; Ramalho, J. C.; Ribeiro-Barros, A. I. Rice biofortification with zinc and selenium: A transcriptomic approach to understand mineral accumulation in flag leaves. *Frontiers in Genetics*, v. 11, p. 543, 2020. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00543>.
- Saleh, A. S. M.; Wang, P.; Wang, N.; Yang, L.; Xiao, Z. Brown rice versus white rice: nutritional quality, potential health benefits, development of food products, and preservation technologies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 18, p. 1070-1096, 2019. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12447>.
- Sánchez-Lucas, R.; Aguilar-Quesada, R.; Orozco, E. R.; Marchal, J. A.; Fernández, A. F.; Jurado-Gámez, B. Selenium-Containing Peptides: Biosynthesis, Bioavailability, and Health Implications. *Antioxidants*, v. 11, p. 111, 2022. <https://doi.org/10.3390/antiox11010111>.
- Shao, G.; Tang, M.; Wang, S.; Shi, L.; Yang, Y.; Shi, Y.; Gu, M.; Wu, F.; Li, Y.; Song, Z.; Cui, H.; Hu, S. Selenite-induced lipid metabolism and hormonal signal changes regulate selenium and nitrogen translocation in rice. *Science of The Total Environment*, v. 809, e151253, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151253>.
- Silva, R. P.; Gonzaga, L. V.; de Andrade, F. O.; Figueiredo, R. W.; Ornelas-Paz, J. J.; de Oliveira, P. V. Biofortification of Rice with Zinc and Selenium: From a Perspective of Improved Nutritional Quality to Human Health. *Foods*, v. 11, p. 47- 54, 2022. <https://doi.org/10.3390/foods11010054>.
- Silva, V. M.; Santos, E. F.; de Rezende, F. F.; Tavanti, R. F. R.; Reis, H. P. G.; Silva, E. A. S.; de Almeida, A. A. F.; Broadley, M. R.; White, P. J.; Dos Reis, A. R. Selenium biofortification of upland rice: Grain yield, yield components, and grain quality. *Plant and Soil*, v. 474, p. 425–439, 2022. <https://doi.org/10.1007/s11104-022-05317-w>.
- Singh, V. K.; Khandelwal, S. Selenium biofortification in cereals and pulses: A sustainable approach to address hidden hunger. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 37, e102127, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102127>.

- Sperotto, R. A.; Ricachenevsky, F. K.; Waldow, V. A. da R.; Fett, J. P. Iron biofortification in rice: It's a long way to the top. *Plant Science*, v. 190, p. 24-39, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.04.010>.
- Steffens, B.; Rasmussen, A. The physiology of adventitious roots. *Plant Physiology*, v. 170, p. 603-617, 2016. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01360>.
- Stuiver, C. E. E.; Weststrate, J. A.; Seewi, G.; Zon, J. C.; Beers, C. Selenium in cereals: Improving the availability. *Foods*, v. 5, p. 1-16, 2016. <https://doi.org/10.3390/foods5010006>.
- Sun, B.; Xu, J.; Fan, X.; Luo, L.; Zhu, Y.; Zhou, X.; Xu, G. Engineering Lysosomal Targeting for Selenium Biofortification in Crop Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 67, p. 13458-13466, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b05386>.
- Sun, B.; Zheng, A.; Jiang, J.; Xu, G. Improvement of folate biosynthesis in genetically modified rice by metabolic engineering. *Plant Biotechnology Journal*, v. 16, p. 2156-2165, 2018. <https://doi.org/10.1111/pbi.12926>.
- Suzuki, K. T.; Katagiri, A.; Sakuma, Y.; Sato, M. Metabolic pathway for selenium in the body: speciation by HPLC-ICP MS with enriched Se. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 28, p. 934-943, 2013. <https://doi.org/10.1039/C3JA30320D>.
- Tan, L.; Zhu, Y.; Fan, T.; Peng, C.; Wang, J.; Sun, L.; Chen, C.; Zhu, Y.; Cai, Y.; Wang, L. Selenium Enrichment in Vegetable Plants by Foliar Application: An Approach to Reduce Deficiency Risks. *ACS Omega*, v. 5, p. 3142-3151, 2020. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b04250>.
- Teixeira, L. S.; Pimenta, T. M.; Brito, F. A. L.; Malheiros, R. S. P.; Arruda, R. S.; Araújo, W. L.; Ribeiro, D. M. Selenium uptake and grain nutritional quality are affected by nitrogen fertilization in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Reports*, v. 40, p. 871-880, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00299-021-02685-6>.
- Terry, N.; Zayed, A. M.; de Souza, M. P.; Tarun, A. S. Selenium in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 51, p. 401-432, 2000. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.51.1.401>.
- Wang, H.; Zou, Z.; Wang, S.; Gong, M. Global transcriptome-wide analysis of CIK cells identify distinct roles of IL-2 and IL-15 in acquisition of cytotoxic capacity against tumor. *BMC Medical Genomics*, v. 6, p. 1-13, 2013. <https://doi.org/10.1186/1755-8794-6-49>.
- Wang, X.; Zhang, M.; Wang, D.; Yao, H.; Wu, W.; Yan, Y.; Ma, C.; Cao, H.; Wang, X.; Yan, X.; Liu, J. Selenium biofortification of rice grain by foliar application: effects on endogenous hormone signaling and selenium distribution. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 170, p. 418-425, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2022.10.003>.
- Wheal, M.S.; Fowles, T.O.; Palmer, L.T. A cost-effective acid digestion method using closed polypropylene tubes for inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) analysis of plant essential elements. *Analytical Methods*, v. 3, p. 2854-2863, 2011. <https://doi.org/10.1039/c1ay05239a>

- Wei, Y.; Shi, A.; Chen, C.; Zhu, Y.; Li, Y.; Fan, T.; Zhao, Z.; Dong, F.; Zhu, Y.; Cai, Y.; Tan, L. Selenium biofortification increases grain yield, total selenium, and storage protein content in rice. *Food Chemistry*, v. 360, e129963, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129963>.
- Xiong, H.; Guo, H.; Xie, Y.; Zhao, L.; Gu, J.; Zhao, S.; Li, J.; Liu, L.; Zhang, Z.; Li, X. Selenium uptake, dynamic distribution and species variation in rice at different developmental stages. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 23, p. 9580-9589, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6209-2>.
- Yang, X.; Yue, S.; Zhang, Y.; Zhang, L.; Chen, W.; Zhao, Y. Effects of selenium biofortification on growth, grain yield and Se content in rice cultivars. *Crop Journal*, v. 10, p. 85-92, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2021.03.009>.
- Yang, Z.; Zhang, B.; Yan, L.; Cao, H.; Ma, Y.; Hu, X.; Rono, J. K.; Chen, X.; Cheng, W. Silicon amendment changes rice physiology and antioxidant enzyme activity to alleviate cadmium stress. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 25, p. 20412-20421, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2091-8>.
- Zhang, L.; Hu, B.; Deng, K.; Gao, X.; Sun, G.; Zhang, Z.; Li, P.; Wang, W.; Li, H.; Zhang, Z.; Fu, Z.; Yang, J.; Gao, S.; Li, L.; Yu, F.; Li, Y.; Ling, H.; Chu, C. NRT1.1B improves selenium concentrations in rice grains by facilitating Selenomethionine translocation. *Plant Biotechnology Journal*, v. 17, p. 1058-1068, 2019. <https://doi.org/10.1111/pbi.13050>
- Zhang, L.; Yang, X.; Zhang, Y.; Zhang, H.; Gu, S.; Li, J.; Wang, W.; Wang, X. Cadmium stress significantly affects cadmium accumulation and physiological traits of two rice varieties with different cadmium tolerances. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 232, e113138, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.113138>.
- Zhang, L.; Zhao, L.; Yue, S.; Zhang, Y.; Chen, W.; Zhao, Y.; Cui, Z. Influence of foliar selenium application on grain yield and grain Se content in rice cultivars. *Field Crops Research*, v. 265, e108081, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2021.108081>.
- Zhang, W.; Yang, X.; Zhang, Y.; Zhang, H.; Yang, Y.; Sun, S.; Liu, H.; Li, J.; Zhang, Y. Foliar application of selenium improves growth and development, alleviates cadmium stress, and increases yield and quality of rice. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 228, e113103, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.113103>.
- Zhang, Y.; Yang, X.; Sun, S.; Zhang, H.; Yue, S.; Zhang, L.; Li, J. Interaction effects of selenium biofortification with different zinc fertilization levels on grain yield and selenium concentration of rice. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, v. 21, p. 2065-2075, 2021. <https://doi.org/10.1007/s42729-021-00502-2>.
- Zhao, H.; Wang, Q.; Ma, L.; Li, J.; Yan, M.; Huang, L. Selenium reduces cadmium uptake and mitigates cadmium toxicity in rice. *Journal of Hazardous Materials*, v. 369, p. 489-496, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.02.008>.

- Zhao, X.; Zhang, L.; Zhao, H.; Li, J.; Guo, J.; Liu, H.; Zhao, Y.; Wu, J.; Cui, Z. Influence of selenium biofortification on grain yield and grain Se content in rice cultivars. *Field Crops Research*, v. 266, e108147, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2021.108147>.
- Zhu, Y.; Chen, C.; Fan, T.; Peng, C.; Wang, J.; Wang, L.; Tan, L. Selenium biofortification in rice: progress and challenges. *Food Science and Nutrition*, v. 10, p. 1078-1090, 2022. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2713>.

MATERIAL SUPLEMENTAR

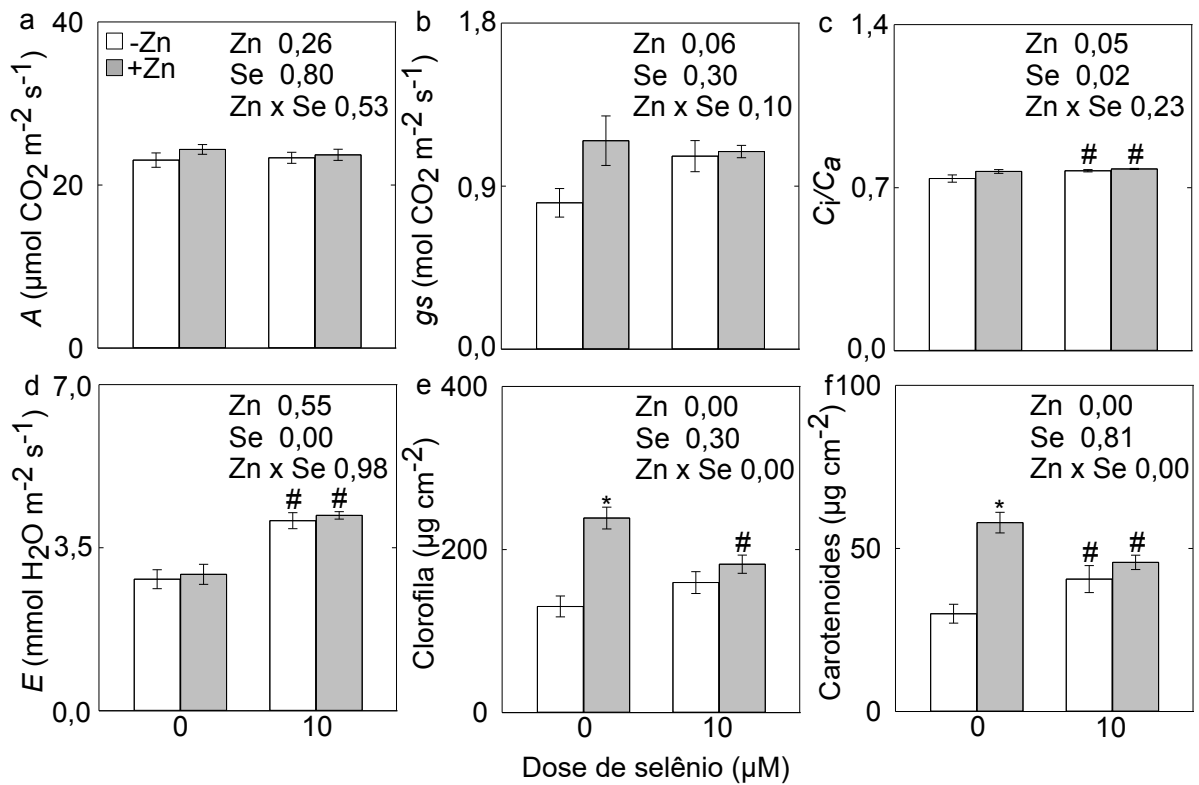


Figura S1. Efeito dos tratamentos com Se e Zn, isolados ou em combinação, nas trocas gasosas e no acúmulo de pigmentos em folhas de plantas de arroz. **a.** Taxa de assimilação líquida de CO₂. **b.** Condutância estomática. **c.** Taxa de transpiração. **d.** Razão de CO₂ intercelular-atmosférico. **e.** Clorofila total **f.** Carotenoides. Asteriscos representam diferença estatística entre os tratamentos com Zn dentro da mesma condição de Se. Hashtags representam diferença estatística entre os tratamentos com Se dentro da mesma condição de Zn. Teste de Tukey ($P < 0,05$). Os dados são média \pm erro padrão de um experimento, com quatro repetições cada.

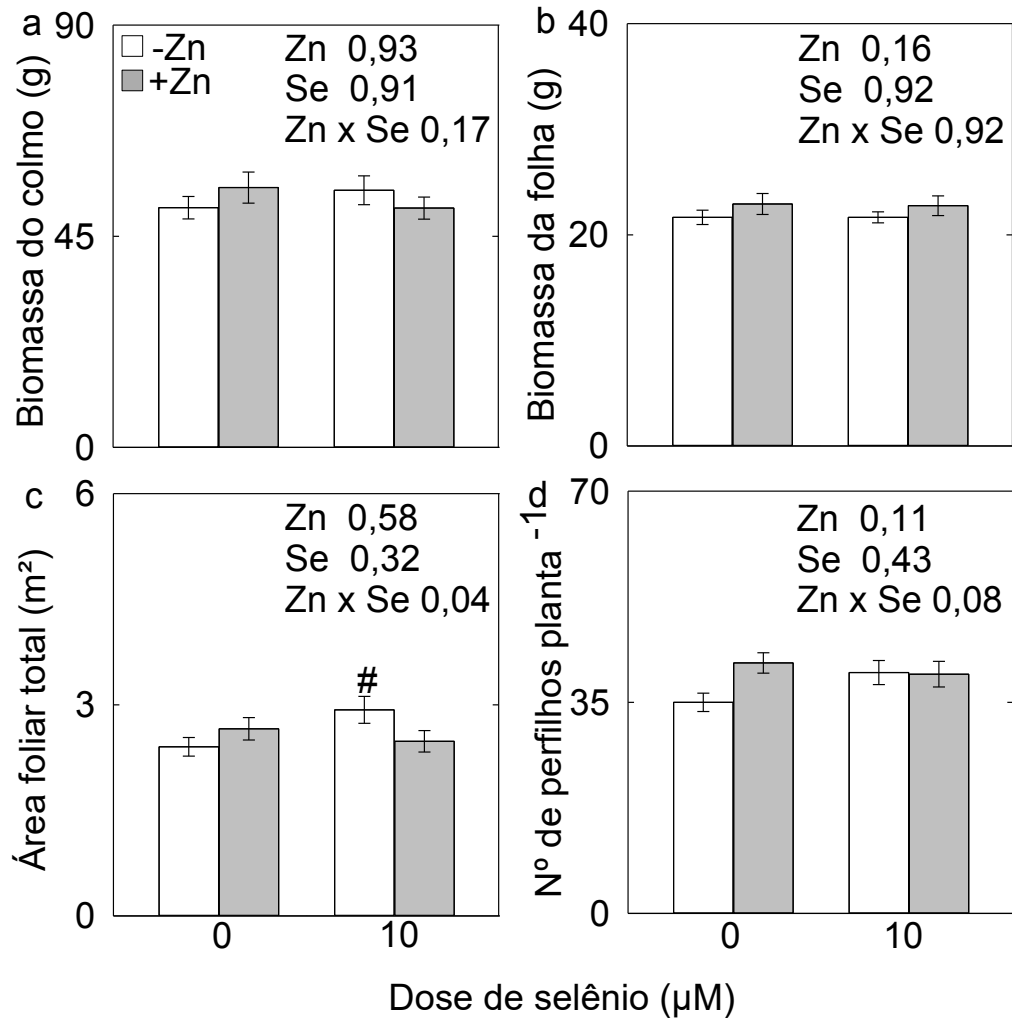


Figura S2. Efeito dos tratamentos com Se e Zn, isolados ou em combinação, nos parâmetros de crescimento de plantas de arroz. **a.** Biomassa de colmos **b.** Biomassa de folhas **c.** Área foliar total **d.** Número de perfilhos por planta. Asteriscos representam diferença estatística entre os tratamentos com Zn dentro da mesma condição de Se. Hashtags representam diferença estatística entre os tratamentos com Se dentro da mesma condição de Zn. Teste Tukey ($P < 0,05$). Os dados são média \pm erro padrão de um experimento, com quatro repetições cada.

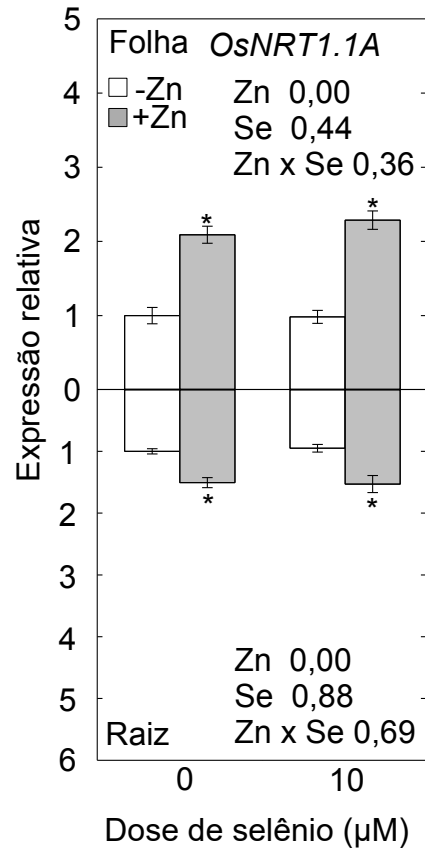


Figura S3. Efeito do Zn e do Se na expressão gênica de *OsNRT1.1A* nos tecidos da raiz e folha bandeira. Os níveis de acúmulo de transcritos foram medidos usando primers específicos de *OsNRT1.1A*, por RT-qPCR e normalizados usando ACTIN como padrão interno. Asteriscos representam diferença estatística entre os tratamentos com Zn dentro da mesma condição de Se. Teste Tukey ($P < 0,05$). Os dados são média \pm erro padrão de um experimento, com quatro repetições cada.

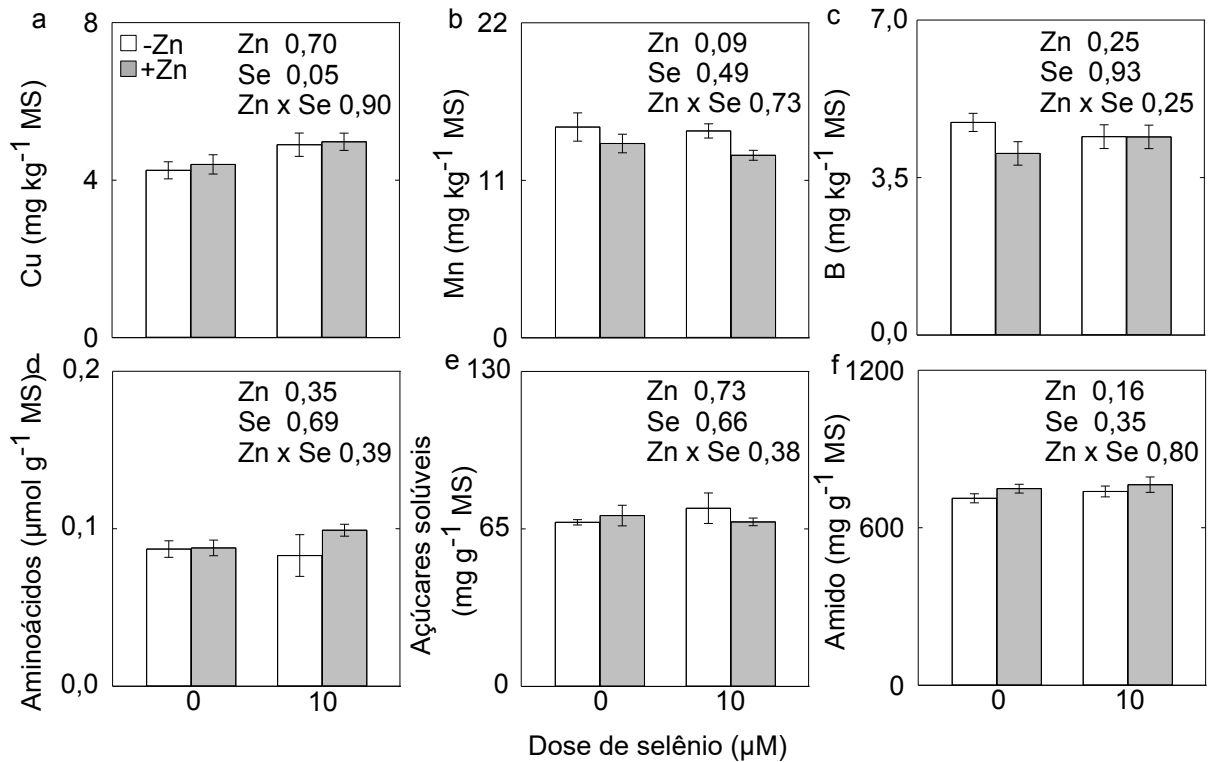


Figura S4. Alterações na composição mineral e compostos de reserva nos grãos de plantas de arroz tratadas com Se e Zn. **a.** Cobre **b.** Manganês **c.** Boro **d.** Aminoácidos Totais **e.** Açúcares solúveis **f.** Amido. Não houve diferença significativa entre os tratamentos. Teste Tukey ($P < 0,05$). Os dados são média \pm erro padrão de um experimento, com quatro repetições cada.

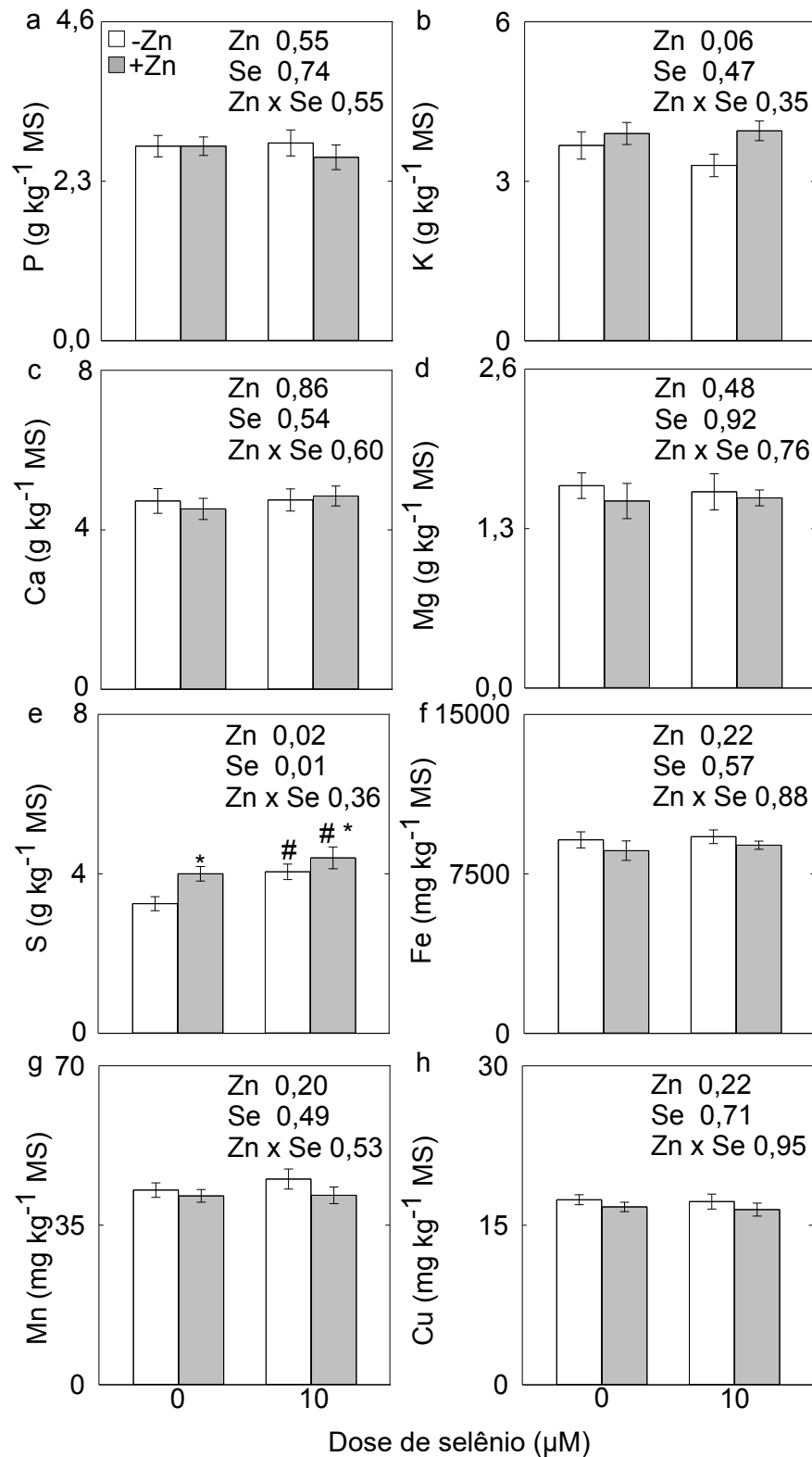


Figura S5. Efeito dos tratamentos com Se e Zn, isolados ou em combinação, na composição mineral da raiz. **a.** Fósforo. **b.** Potássio. **c.** Cálcio. **d.** Magnésio. **e.** Enxofre. **f.** Ferro. **g.** Manganês. **h.** Cobre. Asteriscos representam diferença estatística entre os tratamentos com Zn dentro da mesma condição de Se. Hashtags representam diferença estatística entre os tratamentos com Se dentro da mesma condição de Zn. Teste Tukey ($P < 0,05$). Os dados são média \pm erro padrão de um experimento, com quatro repetições cada.

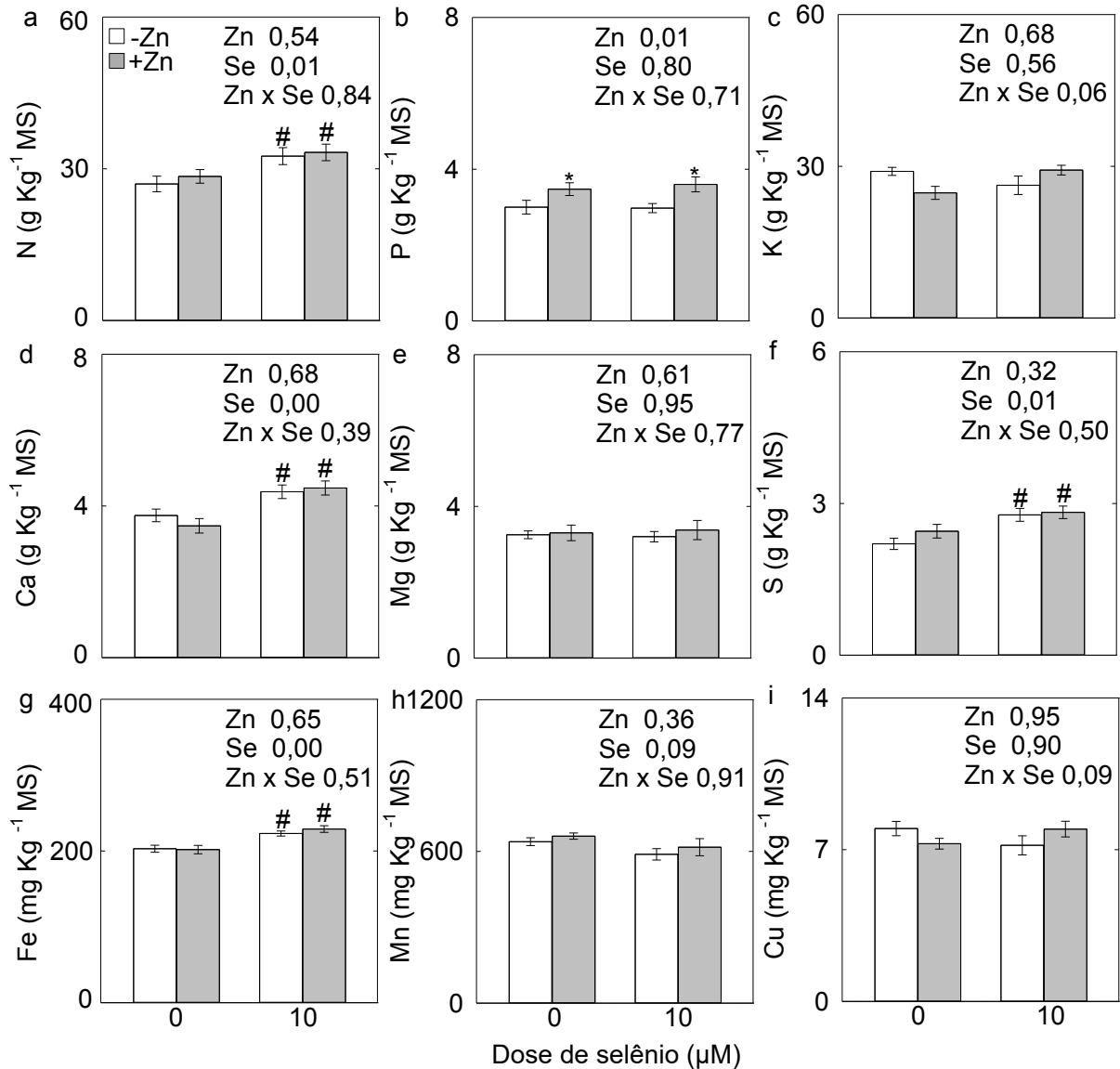


Figura S6. Efeito dos tratamentos com Se e Zn, isolados ou em combinação, na composição mineral da folha. **a.** Nitrogênio **b.** Fósforo **c.** Potássio **d.** Cálcio **e.** Magnésio **f.** Enxofre **g.** Ferro **h.** Manganês **i.** Cobre. Asteriscos representam diferença estatística entre os tratamentos com Zn dentro da mesma condição de Se. Hashtags representam diferença estatística entre os tratamentos com Se dentro da mesma condição de Zn. Teste Tukey ($P < 0,05$). Os dados são média \pm erro padrão de um experimento, com quatro repetições cada.

Tabela S1. Propriedades químicas do solo utilizado nos experimentos.

Propriedades	Solo
pH	5.1
Zn (mg dm ⁻³)	5.2
P (mg dm ⁻³)	166.2
K (mg dm ⁻³)	730
Ca (cmol _c dm ⁻³)	9.6
Mg (cmol _c dm ⁻³)	5.2
Al (cmol _c dm ⁻³)	0.1
H+Al (cmol _c dm ⁻³)	4.6
CEC (cmol _c dm ⁻³)	21.3
m (%)	0.6
V (%)	78.4

P, fósforo; K, potássio; Ca, cálcio; Mg, magnésio; Al, alumínio trocável; H+Al, acidez trocável; CTC, capacidade de troca de cátions; m, saturação por alumínio; e V, saturação por bases.

Tabela S2. Sequência de *primers* usados para RT-qPCR.

Nome	Oligo	Sequência 5'→3'	Referências
<i>PT2</i>	PT2-F	CACAAACTTCCTCGGTATGCT	Teixeira et al. (2021)
	PT2-R	GAAACCCACAAAATCCACAAC	
<i>NIP2.1</i>	NIP2.1-F	GGGGCAATTCAGGTGGATCG	Teixeira et al. (2021)
	NIP2.1-R	TTCTGGGAGGAGCCTTCCTT	
<i>NRT1.1A</i>	NRT1.1A-F	CCCACACCAAGCAATTCAGG	Wang et al. (2018)
	NRT1.1A-R	GTCTTCACCTCCTCCACGTC	
<i>NRT1.1B</i>	NRT1.1B-F	GGCAGGCTCGACTACTTCTA	Teixeira et al. (2021)
	NRT1.1B-R	AGGCGCTTCTCCTTGTAGAC	
<i>SULTR1.2</i>	Sultr1.2-F	TCAAAGAAGAACCCGCTAGAT T	Teixeira et al. (2021)
	Sultr1.2-R	GCAATTCCAAGGAAGCCTTTA A	
<i>ACTINI</i>	Actin1-F	TCCATCTTGGCATCTCTCAG	Teixeira et al. (2021)
	Actin1-R	GTACCCGCATCAGGCATCTG	
<i>ZIP1</i>	ZIP1-F	GTGGAGGAACCTGTGGACGA	Liu et al. (2019)
	ZIP1-R	AGACGACGGTCATGAGGAAG	
<i>ZIP4</i>	ZIP4-F	CAGGGTTGTCTCCCAGGTTC	Ji et al. (2022)
	ZIP4-R	GGAGATCGACCAGGGACATG	
<i>ZIP6</i>	ZIP6-F	CGAGGAGGAAGCAGAAGATG	Ji et al. (2022)
	ZIP6-R	TGTCACCGAGAACATTACGC	
<i>ZIP8</i>	ZIP8-F	GGTGCAGAGCAAAGGCAAGCT	Ji et al. (2022)
	ZIP8-R	AATTCCTCTACATTAGTCCCT GA	
<i>CYP735A3</i>	CYP735A3-F	CATGGTGGAGGCCAAGGTC	Gao et al. (2019)
	CYP735A3-R	TGCCGGTACTCGTCGGAGAT	
<i>CYP735A4</i>	CYP735A4-F	GCTCGTCGAGGCCAAGGT	Gao et al. (2019)
	CYP735A4-R	GGCGGTAGTTGTCCGGAGATG	

**CAPÍTULO II – A BIOSÍNTESE DE CITOCININA É AFETADA PELA
DISPONIBILIDADE DE SELÊNIO E NITRATO PARA REGULAR O
CRESCIMENTO DA PARTE AÉREA E RAÍZES EM PLÂNTULAS DE ARROZ**

RESUMO

O selênio (Se) e o nitrato têm o potencial de modificar a arquitetura da raiz do arroz, mas não está claro como o Se está ligado às mudanças no status de nitrato das plântulas de arroz. Assim, as plântulas de arroz foram cultivadas em soluções nutritivas contendo 0 ou 10 μM de Se que foram suplementadas com 0,05 (condição de baixa concentração de nitrato) ou 5,0 mM de nitrato (condição de alta concentração de nitrato). A aplicação de Se em plântulas tratadas com 0,05 mM de nitrato levou ao acúmulo de açúcar na parte aérea e na raiz e aumentou as concentrações de citocinina na raiz, enquanto diminuiu as concentrações de citocinina na parte aérea em comparação com plântulas crescidas apenas com nitrato 0,05 mM. Isto, por sua vez, resultou na diminuição do crescimento da parte aérea, enquanto a regulação negativa de *OsXTH* e *OsEXP* afetou negativamente a expansão da raiz. Por outro lado, o Se combinado com nitrato 5,0 mM não afetou a concentração de açúcar nos tecidos em comparação com plântulas em nitrato 5,0 mM. Além disso, o Se regulou negativamente a biossíntese de citocininas na parte aérea e nas raízes de plântulas cultivadas sob nitrato 5,0 mM. A redução nas concentrações de citocinina pelo Se sob condições de alta concentração de nitrato diminuiu o crescimento da parte aérea, mas aumentou o crescimento das raízes através da indução de *OsXTH* e *OsEXP*. Assim, muitos dos efeitos do Se no crescimento da parte aérea e das raízes são devidos a uma mudança no status de nitrato das plântulas.

Palavras-chave: Expansão celular; *Oryza sativa*; Alocação raiz - parte aérea; Selenito de sódio.

ABSTRACT

Selenium (Se) and nitrate have the potential to modify rice root architecture, but it is unclear how Se is linked to changes in the rice seedlings nitrate status. Thus, rice seedlings were grown in nutrient solutions containing either 0- or 10- μ M Se that were supplemented with 0.05 (low nitrate condition) or 5.0 mM nitrate (high nitrate condition). Se application to seedlings treated with low nitrate led to sugar accumulation in shoot and root and increased cytokinin concentrations in root, while decreasing cytokinin concentrations in shoot compared with seedlings in 0.05 mM nitrate alone. This, in turn, resulted in decreased shoot growth, while downregulation of *OsXTH* and *OsEXP* negatively affected root expansion. On the other hand, Se combined with 5.0 mM nitrate did not affect sugar concentration in tissues compared with seedlings in 5.0 mM nitrate. Moreover, Se negatively regulated the cytokinin biosynthesis in shoot and root of seedlings grown under 5.0 mM nitrate. The reduction in cytokinin concentrations by Se under high nitrate condition decreased shoot growth, but increased root growth through induction of *OsXTH* and *OsEXP*. Thus, many of the effects of Se in shoot and root growth are due to a shift in nitrate status of the seedlings.

Keywords: Cell expansion; *Oryza sativa*; Shoot-root allocation; Sodium selenite.

1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio é o nutriente mais importante para o crescimento e desenvolvimento das plantas, sendo o nitrato geralmente a principal fonte de nitrogênio inorgânico embora também haja a contribuição do amônio (Ye et al., 2022). Neste contexto, o nitrato em baixa concentração pode estimular o crescimento da raiz seminal do arroz, diminuindo a biossíntese de citocinina (Wang et al., 2020a). Como resultado, a redução na concentração de citocinina atua como um regulador positivo da expressão dos genes da *expansina* (EXP) e da *xiloglucana endotransglucosilase/hidrolase* (XTH), resultando na expansão da raiz seminal. Por outro lado, o aumento na oferta de nitrato aumenta a expressão dos genes *isopentenil transferase* (IPT) e *citocromo P450 monooxigenase* (CYP735A), resultando no acúmulo de citocinina e inibição do alongamento da raiz primária do arroz (Pavlů et al., 2018; Shah et al., 2023). Tomados em conjunto, estes estudos sugerem que o nitrato é eficaz na modulação do crescimento do sistema radicular, modificando a dinâmica da parede celular. Curiosamente, o acúmulo de citocinina na raiz mediado pelo fornecimento de nitrato foi acompanhado por um aumento no transporte de citocinina para a parte aérea através do transportador ABCG14 (Poitout et al., 2018). Assim, é possível que a taxa relativa de crescimento da parte aérea e da raiz seja modulada por sinais de citocinina relacionados ao status de nitrato das plântulas.

A estratégia de crescimento de plântulas é um dos principais fatores que determinam a sobrevivência e a sucessão populacional das plantas em seus habitats (Reed et al., 2022). Uma estratégia adaptativa para plântulas é alterar a morfologia das raízes para melhorar a exploração do solo em busca de nitrogênio (Lynch et al., 2023). Neste contexto, a resposta de crescimento das plântulas a diferentes níveis de nitrogênio envolve modificação nos padrões de alocação de biomassa. Existe uma correlação positiva entre o fornecimento de nitrato e a alocação raiz-parte aérea em plantas de tabaco (Scheible et al., 1997). Nesse sentido, a fertilização com alta concentração de nitrogênio reduz a taxa de crescimento das raízes em comparação com o crescimento da parte aérea, enquanto as plantas deficientes em nitrogênio tendem a reduzir o crescimento da parte aérea e estimular o crescimento da raiz, de modo que as plantas possam melhorar a absorção de minerais do solo (Puig et al., 2012; Hawkesford et al., 2023). No entanto, até agora não está claro como a resposta dependente do nitrogênio ao acúmulo de citocinina atua para alterar a partição da biomassa das plântulas de arroz para manter um equilíbrio funcional entre o crescimento da parte aérea e da raiz em resposta ao fornecimento de nitrato.

A aplicação isolada de selênio (Se) também modifica a arquitetura do sistema radicular de plântulas de arroz por meio de alterações na biossíntese de auxina e etileno (Malheiros et al., 2019). Além disso, foi demonstrado que o Se pode modificar o metabolismo do carbono e do nitrogênio na raiz e na parte aérea (Ribeiro et al., 2016). Como o Se regula positivamente o acúmulo de açúcares nos tecidos vegetais (Dimkovikj e Van Hoewyk, 2014), é possível que a capacidade do nitrogênio de regular a biossíntese de citocininas nas plantas seja dependente da disponibilidade de carbono. As raízes do arroz obtêm Se na forma de selenito, principalmente em solos de várzea onde o arroz irrigado é produzido (Lima et al., 2018; Wang et al., 2020b). A análise molecular e fisiológica em *Arabidopsis* demonstrou que o tratamento com selenito 10 μM e 40 μM aumenta a expressão *in situ* do gene de resposta primária indutível por citocinina (ARR5), que parece associado à inibição do crescimento radicular (Lehotai et al., 2012). Na verdade, a expressão dos genes EXP é regulada pelo selenito nas raízes das plântulas de arroz (Malheiros et al., 2019). Estes estudos sugerem que o equilíbrio entre nitrogênio e citocinina desempenha um papel significativo durante o crescimento das plantas e que o Se poderia de alguma forma afetar o equilíbrio nitrogênio-citocinina. Apesar de muitos estudos relatarem o efeito do nitrato e do Se isoladamente no crescimento das plantas (Lehotai et al., 2012; Ribeiro et al., 2016; Poitout et al., 2018; Wang et al., 2020a), relativamente pouco se sabe sobre o efeito do Se no controle do crescimento de plântulas de arroz após exposição ao nitrato. Uma questão em aberto, portanto, é como as condições de Se e nitrato podem interagir para afetar o crescimento da parte aérea e das raízes das plântulas de arroz. Assim, a elucidação dos mecanismos que controlam o crescimento das plântulas de arroz em resposta à aplicação de Se e à fertilização com nitrato é necessária para avaliar as consequências no desempenho das plântulas durante a fase de crescimento vegetativo.

Neste estudo, testou-se a hipótese de que o Se induz mudanças na interação entre o fornecimento de nitrato e a biossíntese de citocininas para mediar o controle do crescimento da parte aérea e das raízes de plântulas de arroz. Além disso, foi investigado a capacidade do Se de alterar a biossíntese de açúcar e, assim, regular a biossíntese de citocininas e o crescimento de plântulas de arroz em resposta à disponibilidade de nitrato.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Condições de cultivo e delineamento experimental

Sementes de arroz (*Oryza sativa* L. ssp. japônica cv ‘Oochikara’) foram esterilizadas na superfície, embebidas e germinadas conforme descrito por Malheiros et al. (2020). Após a germinação, as plântulas com radícula de 2 cm de comprimento foram transferidas para vasos de 1,5 L (20 plântulas por vaso) preenchidos com soluções nutritivas de Hoagland e Arnon (1950) contendo 0 ou 10 μM de Se, suplementadas com 0,05 (baixa concentração de nitrato) ou nitrato 5,0 mM (condição de nitrato elevado). Além disso, as plântulas foram cultivadas na solução de Hoagland e Arnon suplementada com 10 μM de selenito de sódio. O pH foi ajustado diariamente para 5,5 e a solução foi renovada a cada 2 dias. Os experimentos hidropônicos foram realizados em uma câmara de crescimento (Forma Scientific Inc., Marietta, OH, EUA) sob ciclo dia/noite de 16/8 horas (30/24 °C) com umidade relativa de 60/75% e 150 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidade de luz. Após 7 dias de crescimento, as plântulas foram colhidas, cuidadosamente enxaguadas em água desionizada e depois utilizadas para as análises seguintes. Os valores plotados são a média de três experimentos separados, com cinco réplicas para ensaios fenotípicos, concentrações de citocinina, açúcares, nitrato e selênio, e três réplicas para expressão gênica.

2.2 Avaliação do Crescimento Vegetativo

A cada colheita, a parte aérea e a raiz foram separadas com bisturi e em seguida o comprimento da parte aérea e da raiz foi medido com paquímetro Vernier. As raízes do arroz foram transferidas imediatamente para etanol a 30% (v/v) para evitar qualquer dessecação e, em seguida, os sistemas radiculares foram escaneados usando um scanner de mesa e analisados usando o software de processamento de imagem WinRhizo pro V 2008b (Regent Instruments Inc.; Québec, QC, Canadá) conforme descrito por Zhu et al. (2005). A parte aérea e as raízes foram posteriormente colocadas em sacos de papel e secas em estufa a 60 °C até massa constante para determinação da massa seca.

2.3 Quantificação de nitrato, selênio e açúcares

Para análise de Se nas plântulas de arroz, a parte aérea e a raiz foram secas a 60 °C até que a massa constante fosse digerida em ácido nítrico e a análise óptica de plasma indutivamente acoplado foi realizada conforme descrito anteriormente em El Mehdawi et al. (2018).

A análise de açúcar total e nitrato foi realizada utilizando 100 mg de amostras liofilizadas de parte aérea e raiz. Açúcares e nitratos nos tecidos da parte aérea e radicular de plântulas de arroz foram extraídos e quantificados conforme descrito por Cross et al. (2006). Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços e as absorbâncias de açúcar e nitrato foram medidas em 340 nm e 540 nm, respectivamente, usando um leitor Elisa (Tunable Microplate Reader, VersaMax, Sunny Vale, CA, EUA).

2.4 Análise de citocinina

A extração e determinação de citocinina de amostras de 0,3 g de parte aérea e raiz de plântulas de arroz por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foram realizadas de acordo com o método descrito por Song et al. (2013). Amostras padrão de fração de citocinina (zeatina, zeatina ribosídeo e N⁶-isopenteniladenina) foram obtidas da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

2.5 PCR Quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR)

O RNA total foi isolado de tecidos radiculares congelados usando o reagente Trizol® (Ambion, Life Technology, Carlsbad, CA, EUA) e tratado com DNase. Posteriormente, o cDNA foi sintetizado a partir de 2 µg de RNAs totais utilizando transcriptase reversa Superscript™ III (Invitrogen, Darmstadt, Alemanha), de acordo com o protocolo do fabricante. As reações de PCR foram realizadas utilizando SYBR Green PCR Master Mix e primers específicos de genes e analisadas em um sistema de PCR em tempo real Step-OnePlus (Applied Biosystems, Foster, CA, EUA). Sequências de oligonucleotídeos utilizadas para expressão dos genes EXP e XTH foram selecionadas da literatura e demonstraram regular a expansão celular em plântulas de arroz (Wang et al., 2020a; Malheiros et al., 2019). Ubiquitina (Os03g13170) e Actina (Os03g50885) foram utilizadas como padrões internos (Figueiredo et al., 2012; Li et al., 2016). A expressão relativa foi normalizada com base nesses dois genes e expressa como valores relativos contra plântulas de arroz sob condições de baixa concentração de nitrato. A abundância relativa de transcritos foi calculada usando o método $\Delta\Delta CT$ (Livak et al., 2001). Os primers utilizados para RT-qPCR estão listados na Tabela S1.

2.6 Análise Estatística

Os experimentos foram delineados em distribuição inteiramente casualizada. O modelo Two-way ANOVA ($p < 0,05$) foi aplicado para comparar as médias dos parâmetros medidos com os fatores concentração de selênio e nitrato. O teste F foi utilizado para avaliar as diferenças entre as concentrações de nitrato dentro de cada concentração de Se e vice-versa. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software estatístico R versão 4.1.0.

3 RESULTADOS

O nitrato aumentou o alongamento da parte aérea do arroz de maneira dependente da dose (Figura S1a). O efeito máximo significativo induzido pelo nitrato ocorreu em 5,0 mM quando o comprimento da parte aérea foi aumentado em 42% em comparação com a condição de nitrato muito baixo (0,01 mM de nitrato). Por outro lado, os resultados revelaram que o comprimento da raiz primária das plântulas de arroz aumentou com o aumento do fornecimento de nitrato, atingindo o valor máximo no fornecimento ótimo de nitrato (0,05 mM de nitrato) e depois diminuiu quando o fornecimento de nitrato foi aumentado ainda mais (Figura S1b). Para caracterizar os efeitos do Se no crescimento de plântulas em resposta a mudanças na concentração de nitrato, plântulas de arroz foram cultivadas em soluções nutritivas contendo 0 ou 10 μM de Se que foram suplementadas com 0,05 (condição de baixo nitrato) ou 5,0 mM de nitrato (condição de alto nitrato) (Figura 1a). A aplicação de Se em plântulas tratadas com baixa concentração de nitrato levou à inibição do comprimento da raiz primária (15%), comprimento das raízes laterais (30%), número de raízes laterais (31%), volume da raiz (40%) e biomassa radicular (15%) em comparação com plântulas cultivadas apenas com nitrato 0,05 mM (Figura 1b-f). Além disso, o comprimento da raiz primária, o comprimento das raízes laterais, o número de raízes laterais, o volume da raiz e a biomassa radicular aumentaram em plântulas tratadas com Se cultivadas sob nitrato 5,0 mM em comparação com plântulas cultivadas em nitrato 0,05 mM tratadas com Se, mas não em plântulas tratadas apenas com nitrato, levando a uma interação $N \times \text{Se}$ (Figura 1b-f).

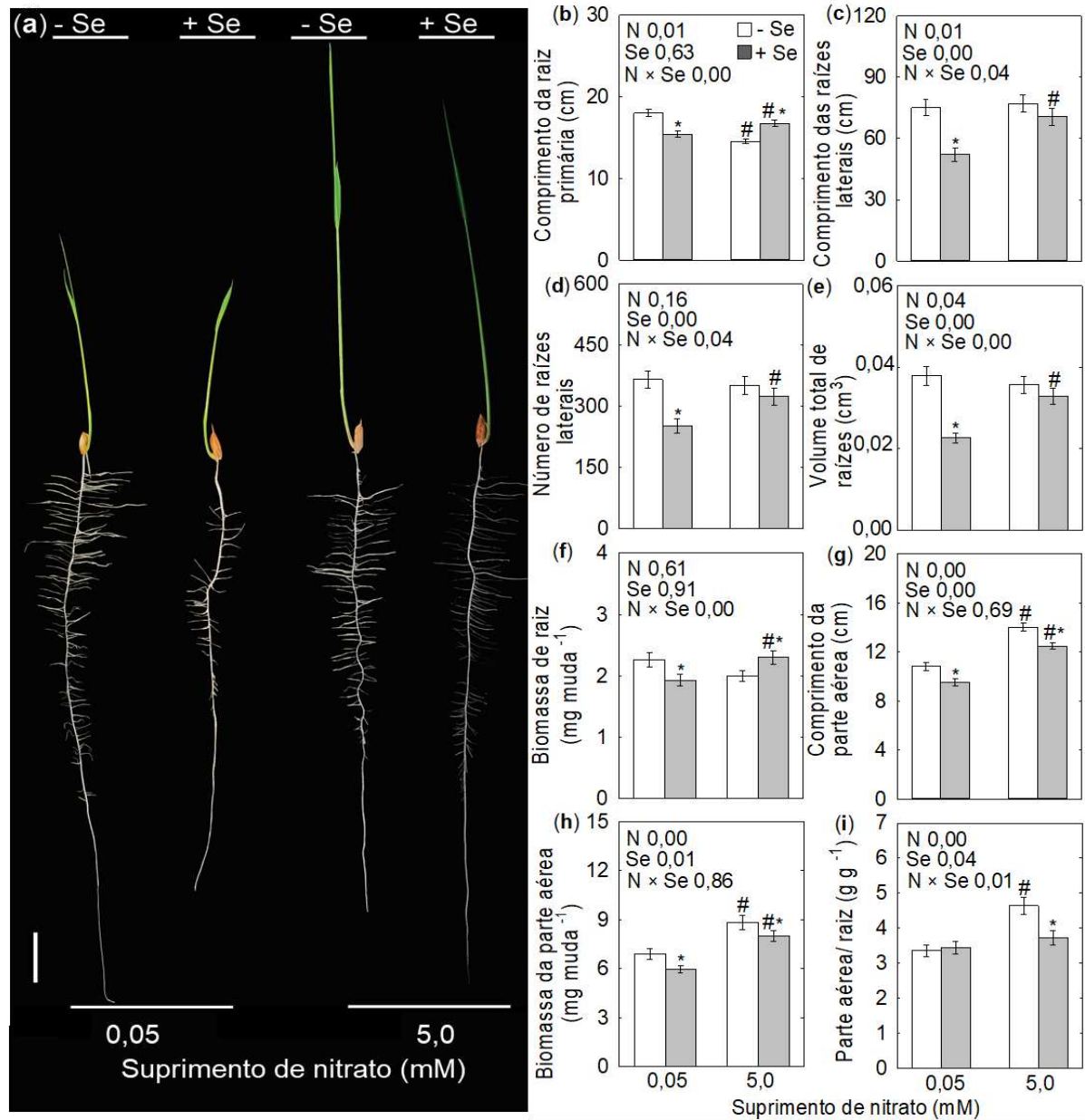


Figura 1. Efeitos dos tratamentos com Se e nitrato, isoladamente e em combinação, no crescimento de plântulas de arroz. **a.** Fenótipo de plantas de arroz cultivadas por 7 dias sob tratamentos com Se e nitrato. A barra de escala representa 2 cm. **b.** Comprimento da raiz primária. **c.** Comprimento total das raízes laterais. **d.** Número de raízes laterais. **e.** Volume total da raiz. **f.** Biomassa radicular. **g.** Comprimento da parte aérea. **h.** Biomassa da parte aérea. **i.** Razão raiz/raiz. Em cada painel, a análise de variância para o efeito do nitrato (N) e do selênio (Se) é mostrada junto com o valor p, onde um valor p menor que 0,05 representa que o fator ou ambos os fatores (N × Se) afeta o resultado. Os asteriscos (*), quando mostrados, indicam médias estatisticamente diferentes entre plantas não tratadas e tratadas com Se nas mesmas condições de nitrato ($p < 0,05$). Hashtags (#), quando mostradas, indicam médias estatisticamente diferentes entre plantas cultivadas sob nitrato 0,05 mM e nitrato 5 mM dentro do mesmo tratamento com Se ($p < 0,05$). Os dados são média ± erro padrão de três experimentos separados, com cinco repetições de 10 plântulas cada.

O comprimento da parte aérea e a biomassa da parte aérea diminuíram nas plântulas tratadas com Se sob 0,05 mM e 5,0 mM de nitrato em comparação com as plântulas cultivadas apenas com nitrato (Figura 1g, h). Por outro lado, o comprimento e a biomassa da parte aérea aumentaram sob 5,0 mM de nitrato tanto nas plântulas tratadas com Se como nas não tratadas em comparação com as plântulas em 0,05 mM de nitrato. Além disso, houve uma interação $N \times Se$ significativa para a relação parte aérea/raiz (Figura 1i). Nesse sentido, houve resposta dependente de Se para relação parte aérea/raiz, que foi modificada pelo fornecimento de nitrato.

Para verificar o efeito do tratamento com Se na biossíntese de citocinina e açúcares, bem como no acúmulo de nitrato e Se em resposta ao nitrato, mediu-se as concentrações de zeatina, zeatina ribosídeo, isopenteniladenina, açúcares solúveis, nitrato e Se na parte aérea e raízes de plântulas tratadas com Se cultivadas sob oferta crescente de nitrato. Em comparação com nitrato 0,05 mM, as concentrações de zeatina, zeatina ribosídeo e isopenteniladenina na parte aérea aumentaram em plântulas não tratadas e tratadas com Se cultivadas com nitrato 5,0 mM (Figura 2a-c). Houve também uma diminuição nas concentrações de zeatina e zeatina ribosídeo na parte aérea de plântulas tratadas com Se em comparação com as não tratadas em ambas as condições de nitrato (Figura 2a, b). As concentrações de zeatina, zeatina ribosídeo e isopenteniladenina nas raízes mostraram uma interação $N \times Se$ significativa (Figura 2a-c). Em comparação com o nitrato sozinho, as concentrações de citocinina aumentaram significativamente nas raízes de plântulas tratadas com Se cultivadas com nitrato 0,05 mM. No entanto, o Se combinado com nitrato 5,0 mM diminuiu as concentrações de zeatina (39%), zeatina ribosídeo (40%) e isopenteniladenina (47%) nas raízes em comparação com plântulas cultivadas sob nitrato 5,0 mM (Figura 2a-c). O tratamento com Se aumentou a concentração de açúcares totais em 82% e 44% na parte aérea e na raiz, respectivamente, em comparação com plântulas não tratadas com Se cultivadas em nitrato 0,05 mM (Figura 2d). Por outro lado, a concentração de açúcares totais na parte aérea e na raiz não foi significativamente afetada pelo Se em nitrato 5,0 mM. Um aumento significativo na concentração de nitrato foi observado tanto na parte aérea quanto na raiz de plântulas cultivadas em nitrato 5,0 mM em comparação com plântulas cultivadas em nitrato 0,05 mM sob ambas as condições de Se (Figura 2e). Curiosamente, a concentração de nitrato na parte aérea mostrou uma interação $N \times Se$ significativa, exibindo uma redução nas plântulas tratadas com Se em comparação com as não tratadas, na concentração de nitrato 5,0 mM. Além disso, o próprio selenito aumentou significativamente a concentração de Se total na parte aérea e na raiz em comparação com plântulas não tratadas com selenito em ambas as condições de nitrato (Figura 2f).

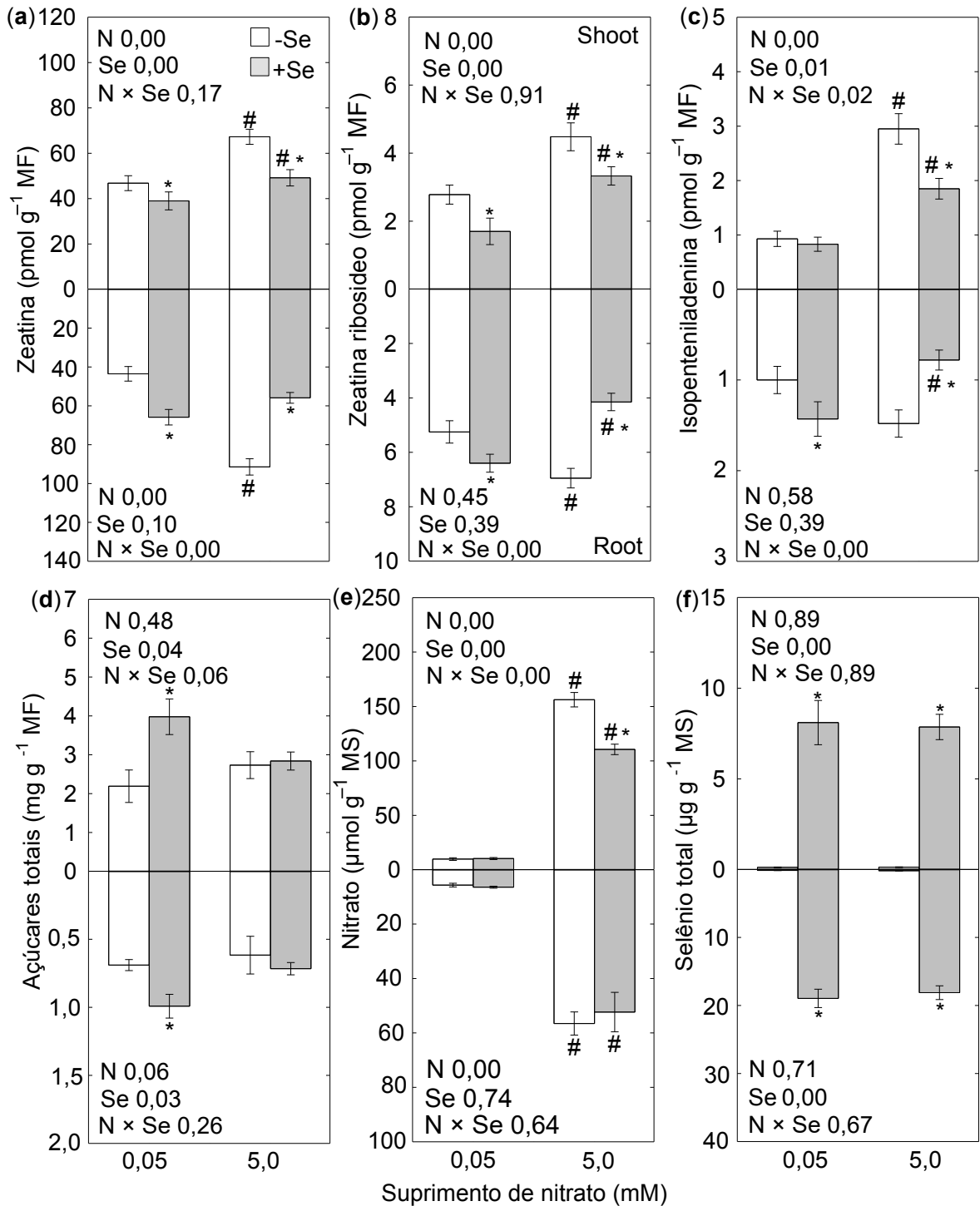


Figura 2. Efeitos dos tratamentos com Se e nitrato, isoladamente e em combinação, nas concentrações de citocinina, açúcares, nitrato e selênio na parte aérea e na raiz de plântulas de arroz. **a.** Zeatina. **b.** Zeatina ribosídeo. **c.** N6-(Δ^2 -isopentenil) adenina. **d.** Açúcares totais. **e.** Nitrato. **f.** Selênio total. Em cada painel, a análise de variância para o efeito do nitrato (N) e do selênio (Se) é mostrada junto com o p-valor, onde um p-valor menor que 0,05 representa que o fator ou ambos os fatores (N \times Se) afeta o resultado. Os asteriscos (*), quando mostrados, indicam médias estatisticamente diferentes entre plantas não tratadas e tratadas com Se nas mesmas condições de nitrato ($p < 0,05$). Hashtags (#), quando mostradas, indicam médias estatisticamente diferentes entre plantas cultivadas sob nitrato 0,05 mM e nitrato 5,0 mM dentro do mesmo tratamento com Se ($p < 0,05$). Os dados são média \pm erro padrão de três experimentos separados, com cinco réplicas cada.

Dada a evidência de que a exposição de plântulas de arroz ao Se em combinação com o aumento da oferta de nitrato resultou em alteração no alongamento da raiz primária e lateral, quantificamos a expressão de mRNA de genes que codificam proteínas envolvidas na expansão celular. Neste contexto, genes relacionados à expansão celular, incluindo *OsEXPI3*, *OsEXPA8*, *OsEXPA14*, *OsEXPB2*, *OsEXPB3*, *OsXTH2*, *OsXTH13* e *OsXTH15* foram regulados positivamente em raízes de plântulas de arroz tratadas com Se em nitrato 5,0 mM em comparação com Se combinado com 0,05 mM nitrato, revelando interações N × Se (Figura 3a-h). Sob nitrato 0,05 mM, houve uma regulação negativa na expressão de *OsEXPA8*, *OsEXPA14*, *OsEXPB2*, *OsEXPB3*, *OsXTH2*, *OsXTH13* e *OsXTH15* nas raízes de plântulas tratadas com Se em comparação com as não tratadas (Figura 3b-h). Além disso, a expressão de *OsEXPI3*, *OsEXPA8*, *OsEXPA14*, *OsXTH13* e *OsXTH15* foi induzida em raízes de plântulas tratadas com Se em comparação com as não tratadas, em nitrato 5,0 mM (Figura 2a-c,g,h). Houve uma diminuição na expressão do gene *OsEXPA14* em raízes de plântulas não tratadas com Se cultivadas em nitrato 5,0 mM em comparação com nitrato 0,05 mM (Figura 3c). Os tratamentos não tiveram efeito na expressão do gene *OsXTH4* em raízes de plântulas de arroz (Figura 3i).

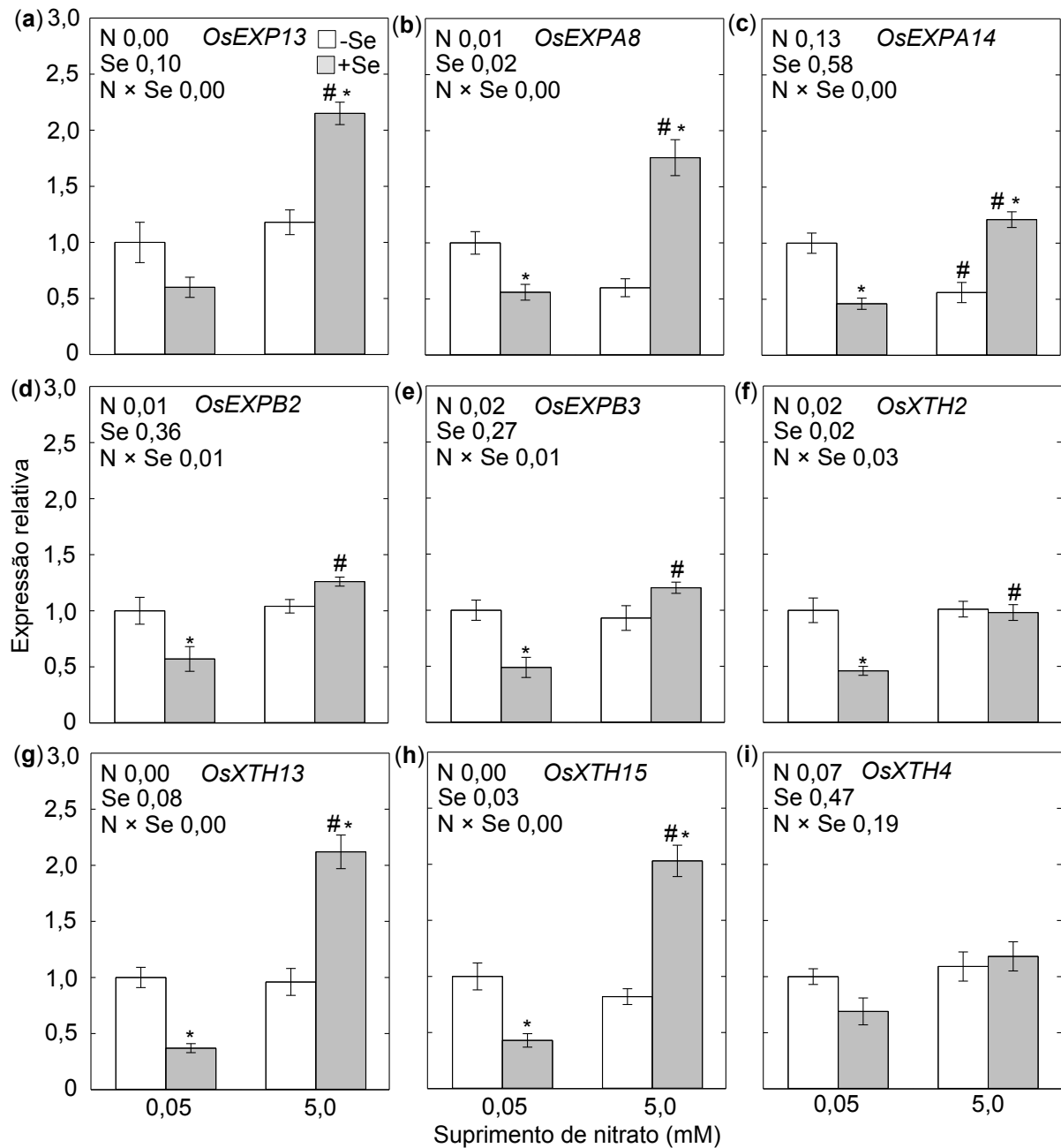


Figura 3. Efeitos dos tratamentos com Se e nitrato, isoladamente e em combinação, na expressão de genes relacionados à expansão celular em raízes de plântulas de arroz. (a – i) Níveis de expressão relativa de *OsEXP13*, *OsEXPA8*, *OsEXPA14*, *OsEXPB2*, *OsEXPB3*, *OsXTH2*, *OsXTH13*, *OsXTH15* e *OsXTH4*, na raiz. Em cada painel, a análise de variância para o efeito do nitrato (N) e do selênio (Se) é mostrada junto com o p-valor, onde um p-valor menor que 0,05 representa que o fator ou ambos os fatores (N x Se) afeta o resultado. Os asteriscos (*), quando mostrados, indicam médias estatisticamente diferentes entre plantas não tratadas e tratadas com Se nas mesmas condições de nitrato ($p < 0,05$). Hashtags (#), quando mostradas, indicam médias estatisticamente diferentes entre plantas cultivadas sob nitrato 0,05 mM e nitrato 5,0 mM dentro do mesmo tratamento com Se ($p < 0,05$). Os dados são média \pm erro padrão de três experimentos separados, com três réplicas cada.

4 DISCUSSÃO

A disponibilidade de Se modifica a arquitetura do sistema radicular em plântulas de arroz, o que está associado ao aumento do alongamento da raiz primária e à diminuição das raízes laterais (Malheiros et al., 2019). A arquitetura do sistema radicular também é regulada por outros minerais, incluindo o nitrogênio, que tem um efeito positivo tanto na biossíntese quanto na sinalização de citocininas (Kamada-Nobusada et al., 2013). Os resultados do presente estudo mostraram que o fornecimento de Se às plântulas tratadas com baixa concentração de nitrato aumentou as concentrações de citocininas nas raízes, e os açúcares derivados da fotossíntese foram responsáveis pela indução, resultado que foi associado a alterações fenotípicas no sistema radicular. Além disso, a aplicação de Se em plântulas tratadas com alta concentração de nitrato resultou em um papel antagônico do Se e do nitrato na regulação da biossíntese de citocinina, o que impactou o crescimento da parte aérea e a arquitetura do sistema radicular das plântulas de arroz.

Foi documentado que a disponibilidade reduzida de nitrogênio inibe a biossíntese de citocininas e estimula o alongamento da raiz primária de plântulas de arroz (Wang et al., 2020a). Consistente com esta visão, este estudo revelou que o alongamento da raiz primária aumentou em plântulas tratadas com baixa concentração de nitrato em comparação com plântulas crescidas em alto nitrato devido a uma diminuição nas concentrações de zeatina e zeatina ribosídeo. Todavia esse efeito não foi verificado em raízes de plântulas tratadas com Se cultivadas em condição de baixo nitrato (Figuras 1 e 2). A este respeito, a aplicação de Se em plântulas tratadas com baixa concentração de nitrato aumentou as concentrações de citocinina nas raízes e diminuiu não apenas o tamanho das raízes, mas também o número de raízes laterais em comparação com plântulas cultivadas apenas com nitrato 0,05 mM (Figuras 1 e 2). A diminuição nas concentrações de citocinina causa o alongamento das células radiculares, aumentando a expressão dos genes *EXP* e *XTH* nas raízes de plântulas de arroz cultivadas sob condição de deficiência de nitrogênio (Wang et al., 2020a). Nesta configuração experimental, o Se combinado com nitrato 0,05 mM diminuiu a expressão de *OsEXPA8*, *OsEXPA14*, *OsEXPB2*, *OsEXPB3*, *OsXTH2*, *OsXTH13* e *OsXTH15* nas raízes em comparação com plântulas cultivadas apenas em nitrato 0,05 mM (Figura 3). Estes resultados implicam que o Se medeia a regulação negativa dos genes *EXP* e *XTH* através da indução da biossíntese de citocinina em resposta à baixa disponibilidade de nitrato. Além disso, este estudo sugere que o efeito do Se na biossíntese de citocinina em raízes de plântulas tratadas com baixa concentração de nitrato é dependente de mudanças nas concentrações de açúcar na parte aérea, o que por sua

vez aumentou a concentração de citocinina nas raízes (Figura 2). Esse achado é consistente com relatos anteriores de que os açúcares gerados pela fotossíntese nas folhas causam aumento na biossíntese de citocininas nas raízes das plantas *Arabidopsis* (Kiba et al., 2019; Sakakibara et al., 2021). Curiosamente, as plântulas crescidas com nitrato 0,05 mM associado à fertilização com Se apresentam proporções parte aérea/raiz semelhantes e concentrações diminuídas de zeatina e zeatina ribosídeo na parte aérea em comparação com plântulas crescidas apenas com nitrato 0,05 mM (Figuras 1 e 2). Assim, é provável que a relação parte aérea/raiz só aumente quando a citocinina se acumula na parte aérea, e que esta resposta possa ser separada do efeito da concentração de açúcar na parte aérea. De fato, a maior relação parte aérea/raiz de plântulas não tratadas com Se em comparação com plântulas tratadas com Se cultivadas com nitrato 5,0 mM foi relacionada ao acúmulo de zeatina, zeatina ribosídeo e isopenteniladenina na parte aérea (Figuras 1 e 2).

A aplicação de nitrato nas raízes atua como um sinal para induzir a sinalização da citocinina nas folhas (Sakakibara et al., 1999). Os resultados do presente estudo indicaram que o acúmulo de nitrato e citocinina na parte aérea de plântulas de arroz cultivadas em 5,0 mM foi acompanhado pela inibição do alongamento da raiz primária e um aumento na relação parte aérea/raiz em comparação com plântulas tratadas com Se combinado com aumento da oferta de nitrato (Figuras 1 e 2). Foi apontado que o acúmulo de nitrato na parte aérea das plantas de tabaco foi positivamente correlacionado com uma inibição do crescimento radicular e um aumento na relação parte aérea/raiz (Scheible et al., 1997). Parece possível, portanto, que o Se tenha alterado o acúmulo de nitrato e a biossíntese de citocininas em plântulas de arroz cultivadas sob condições de alta concentração de nitrato. Consistente com esta observação, plântulas de arroz tratadas com Se cultivadas sob nitrato de 5,0 mM apresentaram diminuição do crescimento da parte aérea, o que foi acompanhado de uma redução nas concentrações de zeatina, zeatina ribosídeo e isopenteniladenina na parte aérea e na raiz, enquanto exibiu um aumento na biomassa da raiz em comparação com plântulas fornecidas com nitrato 5,0 mM (Figuras 1 e 2). Além disso, a aplicação de Se em plântulas tratadas com alta concentração de nitrato resultou na regulação positiva de *OsEXP13*, *OsEXPA8*, *OsEXPA14*, *OsXTH13* e *OsXTH15* nas raízes em comparação com plântulas sob concentração de nitrato 5,0 mM, o que por sua vez aumentou o tamanho da raiz (Figuras 1 e 3). Assim, foi proposto que a regulação positiva dos genes *EXP* e *XTH* nas raízes de plântulas cultivadas sob alto suprimento de nitrato é mediada por Se através da inibição da biossíntese de citocininas. De fato, as concentrações de zeatina, zeatina ribosídeo e isopenteniladenina nas raízes do arroz aumentaram com o tratamento com Se sob baixa concentração de nitrato, mas não sob condições de alto nitrato,

devido às interações Se \times nitrato (Figura 2). Nesse sentido, houve resposta dependente de Se para acúmulo de citocinina nas raízes das plântulas de arroz, que foi modificada pelo fornecimento de nitrato. Juntos, esses achados sugerem que a redução no tamanho da parte aérea devido ao tratamento com Se sob condições de alto nitrato pode ser atribuída à menor translocação de citocinina entre a raiz e a parte aérea.

Os resultados deste estudo estão integrados em um modelo apresentado na Figura 4, no qual a baixa concentração de nitrato causa uma diminuição nas concentrações de citocinina nas raízes e reduz a translocação para a parte aérea. Assim, a inibição do acúmulo de citocinina na raiz e na parte aérea pela condição de baixo nitrato aumenta o alongamento da raiz primária e diminui o tamanho da parte aérea das plântulas de arroz. Além disso, o Se mais a baixa concentração de nitrato leva ao aumento da concentração de açúcar na parte aérea e na raiz, ao aumento das concentrações de citocinina na raiz e à inibição da taxa absoluta de crescimento da raiz. Por outro lado, a condição elevada de nitrato aumenta a biossíntese de citocininas na raiz e a translocação para a parte aérea, levando à diminuição do alongamento da raiz primária e ao aumento do tamanho da parte aérea. Além disso, o Se regula negativamente a biossíntese de citocinina nas raízes de plântulas de arroz cultivadas sob condições de alto nitrato, diminuindo assim a translocação de citocinina para a parte aérea. Assim, a redução nas concentrações de citocinina por Se associado a condição de alto nitrato, diminui o tamanho da parte aérea, enquanto aumenta o alongamento da raiz primária e a biomassa total da raiz. Curiosamente, a fertilização com Se e nitrogênio melhora a composição nutricional dos grãos de arroz (Teixeira et al., 2021). Isto, juntamente com o fato de que o Se combinado com o nitrato afeta o crescimento das plântulas de arroz, sugere um papel proeminente do Se e do nitrogênio na melhoria do desempenho das plantas de arroz.

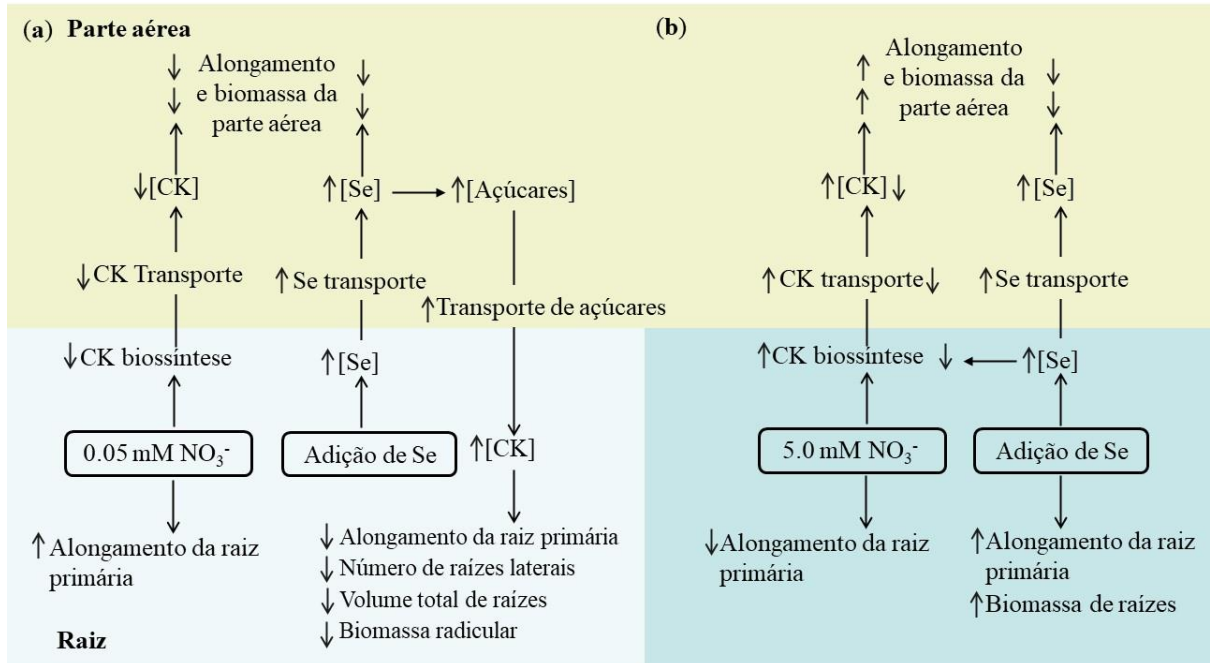


Figura 4. Esquema que resume os efeitos dos tratamentos com Se e nitrato, isoladamente e em combinação, no crescimento de plântulas de arroz. Diagramas de plântulas de arroz cultivadas sob condições de baixa concentração de nitrato **a.** e alta concentração de nitrato **b.** isoladamente e em combinação com Se. O tratamento de plântulas de arroz com nitrato 0,05 mM diminui a biossíntese de citocininas na parte aérea e na raiz, o que pode então aumentar o alongamento da raiz primária enquanto diminui o tamanho da parte aérea em comparação com plântulas cultivadas em nitrato 5 mM. Além disso, a aplicação de Se em plântulas tratadas com baixa concentração de nitrato aumenta as concentrações de açúcar na parte aérea e na raiz e aumenta as concentrações de citocinina na raiz, enquanto diminui o tamanho da raiz em comparação com plântulas apenas com nitrato 0,05 mM. Por outro lado, plântulas cultivadas em nitrato 5,0 mM apresentam altas concentrações de citocinina na raiz e na parte aérea, o tamanho da parte aérea aumenta e o alongamento da raiz primária diminui em comparação com plântulas em nitrato 0,05 mM. Além disso, o Se regula negativamente a biossíntese de citocininas nas raízes de plântulas de arroz cultivadas sob condições de alta concentração de nitrato, diminuindo assim a translocação de citocinina para a parte aérea em comparação com plântulas apenas com 5,0 mM de nitrato. A redução nas concentrações de citocinina pelo Se sob condições de alta concentração de nitrato diminui o tamanho da parte aérea, enquanto aumenta o tamanho da raiz.

5 CONCLUSÃO

Em resumo, a aplicação de Se em plântulas tratadas com baixa concentração de nitrato diminui o tamanho das raízes e da parte aérea através da alteração do equilíbrio de açúcares e citocininas. O acúmulo de açúcar na parte aérea sob aplicação de Se em plântulas tratadas com baixa concentração de nitrato provavelmente está relacionado à redução no crescimento radicular, no qual a estimulação da biossíntese de citocinina e o acúmulo de açúcar nas raízes estão ligados. Neste caso, os resultados indicam que o Se regula o metabolismo do açúcar e a biossíntese de citocininas para lidar com a condição de baixo nitrato. O aumento da oferta de

nitrate induz a biossíntese de citocininas nas raízes, enquanto o Se resulta em efeitos opostos. Portanto, o aumento do tamanho das raízes das plântulas de arroz provavelmente ocorre através da inibição da biossíntese de citocininas. Neste caso, as diminuições nas concentrações de citocininas nas raízes estão associadas a um aumento na expressão de genes relacionados à expansão celular, incluindo *OsEXP13*, *OsEXPA8*, *OsEXPA14*, *OsXTH13* e *OsXTH15*, que por sua vez alteram a arquitetura radicular em plântulas de arroz. Além disso, o Se diminui o crescimento da parte aérea das plântulas de arroz sob condições de alto nitrato, diminuindo a translocação de citocinina entre a raiz e a parte aérea.

REFERÊNCIAS

- Cross, J. M.; von Korff, M.; Altmann, T.; Bartzetko, L.; Sulpice, R.; Gibon, Y.; Palacios, N.; Stitt, M. Variation of enzyme activities and metabolite levels in 24 *Arabidopsis* accessions growing in carbon-limited conditions. *Plant Physiology*, v. 142, p. 1574–1588, 2006. <https://doi.org/10.1104/pp.106.086629>.
- Dimkovikj, A.; Van Hoewyk, D. Selenite activates the alternative oxidase pathway and alters primary metabolism in *Brassica napus* roots: Evidence of a mitochondrial stress response. *BMC Plant Biology*, v. 14, p. 259, 2014. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0259-6>.
- El Mehdawi, A. F.; Jiang, Y.; Guignardi, Z. S.; Esmat, A.; Pilon, M.; Pilon-Smits, E. A. H.; Schiavon, M. Influence of sulfate supply on selenium uptake dynamics and expression of sulfate/selenate transporters in selenium hyperaccumulator and non-hyperaccumulator Brassicaceae. *New Phytologist*, v. 217, p. 194–205, 2018. <https://doi.org/10.1111/nph.14838>.
- Figueiredo, D. D.; Barros, P. M.; Cordeiro, A. M.; Serra, T. S.; Lourenço, T.; Chander, S.; Oliveira, M. M.; Saibo, N. J. Seven zinc-finger transcription factors are novel regulators of the stress responsive gene *OsDREB1B*. *Journal of Experimental Botany*, v. 63, p. 3643–3656, 2012. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers035>.
- Hawkesford, M. J.; Cakmak, I.; Coskun, D.; De Kok, L. J.; Lambers, H.; Schjoerring, J.; Branco, F. J. Functions of macronutrients. In *Marschner's Mineral Nutrition of Plants*, 4th ed.; Rengel, Z., Cakmak, I., White, P. J., Eds.; Elsevier: London, UK, 2023; pp. 201–281. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819773-8.00019-8>.
- Hoagland, D. R.; Arnon, D. I. *The Water Culture Method for Growing Plants Without Soils*; California Agricultural Experimental Station: Berkeley, CA, USA, 1950.
- Kamada-Nobusada, T.; Makita, N.; Kojima, M.; Sakakibara, H. Nitrogen-dependent regulation of de novo cytokinin biosynthesis in rice: The role of glutamine metabolism as an additional signal. *Plant and Cell Physiology*, v. 54, p. 1881–1893, 2013. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct127>.
- Kiba, T.; Takebayashi, Y.; Kojima, M.; Sakakibara, H. Sugar-induced de novo cytokinin biosynthesis contributes to *Arabidopsis* growth under elevated CO₂. *Scientific Reports*, v. 9, p. 7765, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44185-4>.
- Lehotai, N.; Kolbert, Z.; Peto, A.; Feigl, G.; Ordog, A.; Kumar, D.; Tari, I.; Erdei, L. Selenite-induced hormonal and signalling mechanisms during growth of *Arabidopsis thaliana* L. *Journal of Experimental Botany*, v. 63, p. 5677–5687, 2012. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers222>.
- Li, X.; Yang, D.-L.; Sun, L.; Li, Q.; Mao, B.; He, Z. The systemic acquired resistance regulator *OsNPR1* attenuates growth by repressing auxin signaling through promoting IAA-Amido synthase expression. *Plant Physiology*, v. 172, p. 546–558, 2016. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00129>.

- Lima, L. W.; Pilon-Smits, E. A. H.; Schiavon, M. Mechanisms of selenium hyperaccumulation in plants: A survey of molecular, biochemical and ecological cues. *BBA - General Subjects*, v. 1862, p. 2343–2353, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.03.028>.
- Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C(T)$) Method. *Methods*, v. 25, p. 402–408, 2001. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Lynch, J. P.; Galindo-Castañeda, T.; Schneider, H. M.; Sidhu, J. S.; Rangarajan, H.; York, L. M. Root phenotypes for improved nitrogen capture. *Plant and Soil*, Advance online publication, 2023. <https://doi.org/10.1007/s11104-023-06301-2>.
- Malheiros, R. S. P.; Costa, L. C.; Ávila, R. T.; Pimenta, T. M.; Teixeira, L. S.; Brito, F. A. L.; Zsögön, A.; Araújo, W. L.; Ribeiro, D. M. Selenium downregulates auxin and ethylene biosynthesis in rice seedlings to modify primary metabolism and root architecture. *Planta*, v. 250, p. 333–345, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03175-6>.
- Malheiros, R. S. P.; Gonçalves, F. C. M.; Brito, F. A. L.; Zsögön, A.; Ribeiro, D. M. Selenomethionine induces oxidative stress and modifies growth in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings through effects on hormone biosynthesis and primary metabolism. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 189, p. 109942, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109942>.
- Pavlů, J.; Novák, J.; Koukalová, V.; Luklová, M.; Brzobohatý, B.; Černý, M. Cytokinin at the Crossroads of abiotic stress signalling pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, p. 2450, 2018. <https://doi.org/10.3390/ijms19082450>.
- Poitout, A.; Crabos, A.; Petřík, I.; Novák, O.; Krouk, G.; Lacombe, B.; Ruffel, S. Responses to systemic nitrogen signaling in Arabidopsis roots involve trans-zeatin in shoots. *Plant Cell*, v. 30, p. 1243–1257, 2018. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00011>.
- Puig, J.; Pauluzzi, G.; Guiderdoni, E.; Gantet, P. Regulation of shoot and root development through mutual signaling. *Molecular Plant*, v. 5, p. 974–983, 2012. <https://doi.org/10.1093/mp/sss047>.
- Reed, R. C.; Bradford, K. J.; Khanday, I. Seed germination and vigor: Ensuring crop sustainability in a changing climate. *Heredity*, v. 128, p. 450–459, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41437-022-00497-2>.
- Ribeiro, D. M.; Silva Júnior, D. D.; Cardoso, F. B.; Martins, A. O.; Silva, W. A.; Nascimento, V. L.; Araújo, W. L. Growth inhibition by selenium is associated with changes in primary metabolism and nutrient levels in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Environment*, v. 39, p. 2235–2246, 2016. <https://doi.org/10.1111/pce.12783>.
- Sakakibara, H. Cytokinin biosynthesis and transport for systemic nitrogen signaling. *Plant Journal*, v. 105, p. 421–430, 2021. <https://doi.org/10.1111/tbj.15011>.
- Sakakibara, H.; Hayakawa, A.; Deji, A.; Gawronski, S. W.; Sugiyama, T. His-Asp phosphotransfer possibly involved in the nitrogen signal transduction mediated by cytokinin in maize: Molecular cloning of cDNAs for two-component regulatory factors and demonstration of phosphotransfer activity in vitro. *Plant Molecular Biology*, v. 41, p. 563–573, 1999. <https://doi.org/10.1023/A:1006391304881>.

- Scheible, W.-R.; Lauerer, M.; Schulze, E.-D.; Caboche, M.; Stitt, M. Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. *Plant Journal*, v. 11, p. 671–691, 1997. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1997.11040671.x>.
- Shah, S.; Cai, L.; Li, X.; Fahad, S.; Wang, D. Influence of cultivation practices on the metabolism of cytokinin and its correlation in rice production. *Food Energy Security*, v. 12, p. 488, 2023. <https://doi.org/10.1002/fes3.488>.
- Song, W.; Li, J.; Sun, H.; Huang, S.; Gong, X.; Ma, Q.; Zhang, Y.; Xu, G. Increased photosynthetic capacity in response to nitrate is correlated with enhanced cytokinin levels in rice cultivar with high responsiveness to nitrogen nutrients. *Plant and Soil*, v. 373, p. 981–993, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1867-x>.
- Teixeira, L. S.; Pimenta, T. M.; Brito, F. A. L.; Malheiros, R. S. P.; Arruda, R. S.; Araújo, W. L.; Ribeiro, D. M. Selenium uptake and grain nutritional quality are affected by nitrogen fertilization in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Reports*, v. 40, p. 871–880, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00299-021-02685-6>.
- Wang, K.; Wang, Y.; Li, K.; Wan, Y.; Wang, Q.; Zhuang, Z.; Guo, Y.; Li, H. Uptake, translocation and biotransformation of selenium nanoparticles in rice seedlings (*Oryza sativa* L.). *Journal of Nanobiotechnology*, v. 18, p. 103, 2020. <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00659-6>.
- Wang, Q.; Zhu, Y.; Zou, X.; Li, F.; Zhang, J.; Kang, Z.; Li, X.; Yin, C.; Lin, Y. Nitrogen Deficiency-Induced Decrease in Cytokinins Content Promotes Rice Seminal Root Growth by Promoting Root Meristem Cell Proliferation and Cell Elongation. *Cells*, v. 9, p. 916, 2020. <https://doi.org/10.3390/cells9040916>.
- Ye, J. Y.; Tian, W. H.; Jin, C. W. Nitrogen in plants: From nutrition to the modulation of abiotic stress adaptation. *Stress Biology*, v. 2, p. 4, 2022. <https://doi.org/10.1007/s44154-021-00030-1>.
- Zhu, J.; Kaeppeler, S.; Lynch, J. P. Mapping of QTLs for lateral root branching and length in maize (*Zea mays* L.) under differential phosphorus supply. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 111, p. 688–695, 2005. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-2051-3>.

MATERIAL SUPLEMENTAR

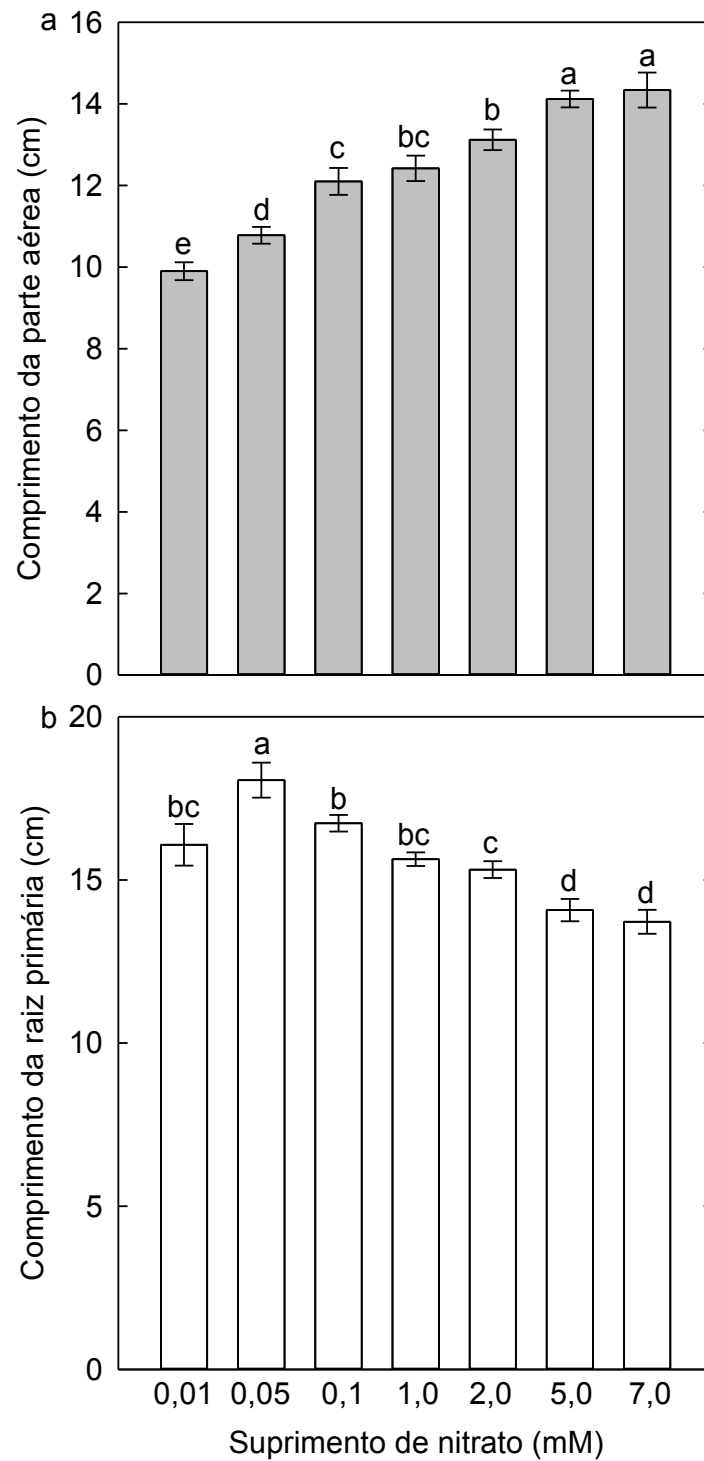


Figura S1. Efeito do nitrato na parte aérea e na raiz de plântulas de arroz. O comprimento da parte aérea e da raiz primária foram avaliados 7 dias após o início da incubação das plântulas de arroz em soluções de nitrato. **a.** Curva dose-resposta de nitrato para comprimento da parte aérea. **b.** Curva dose-resposta de nitrato para comprimento da raiz primária. Valores com a mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 5% pelo teste de Duncan. Os dados são média \pm erro padrão de três experimentos separados, com cinco repetições de 10 plântulas cada.

Tabela S1. Sequências de primers usadas para PCR em tempo real.

Nome	Sequência de Primers	
	Forward	Reverse
<i>OsEXP13</i>	ACCAAAGGGTTCCTTGCATGA	ACTTGGAGCCCTTCACGTCC
<i>OsEXPA8</i>	TACACCTCCTCGGCTCAGTTCTAC	TGCCACGTTCGATCAAAGCATAAC
<i>OsEXPA14</i>	CCCGGTTATCTACCAAAGGGTTCC	AGTCGTGCCCCGTTAATGGTAAAC
<i>OsEXPB2</i>	CAACCAGTACCCGTTTCATGTCC	GTTGTTGGTGCACCGTATCTGG
<i>OsEXPB3</i>	TGCGGGTTCAAGAACACCAACC	GGGTGGTTGACGCATCTTATCTGG
<i>OsXTH2</i>	TGATCGCGTTCTTCGTGGAC	TCCACAGGCTGGAGTAGAGC
<i>OsXTH4</i>	TCTGGAATGCCGATGACTGG	GCAAGCGATAGCCCTGTAGT
<i>OsXTH13</i>	GGTGTTCGCAACTACCAGA	CCCATATGCTCGAGTAGGCG
<i>OsXTH15</i>	CAGTGTGACATCACGTGGGA	TTGGTCCGGAGCATAACAACC
<i>OsUBQ5</i>	ACCACTTCGACCGCCACTACT	ACGCCTAAGCCTGCTGGTT
<i>OsACTIN</i>	TGGATTGGAGGATCCATCTTGGC	CCTTGGCAATCCACATCTGCTG

CAPÍTULO III – EFEITOS DA CITOCININA E DO SELÊNIO NOS ASPECTOS FISIOLÓGICOS E DA PRODUÇÃO DE PLANTAS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.)

RESUMO

As citocininas e o selênio (Se) podem modular a produção e modificar a composição nutricional de grãos de arroz. No entanto, não está claro como a aplicação combinada de citocinina e Se afetam o rendimento, o enchimento e a qualidade nutricional do grão de arroz. No presente estudo, a citocinina melhorou o enchimento de grãos e os parâmetros de rendimento do arroz independente da disponibilidade do Se. No entanto, a citocinina reduziu a biomassa de raízes, mesmo nas plantas tratadas com Se. Por outro lado, a citocinina aumentou a taxa de fotossíntese líquida durante o início do enchimento dos grãos, melhorando a capacidade das folhas em produzir fotoassimilados para sustentar o desenvolvimento dos grãos. Notavelmente, a citocinina alterou a composição das proteínas de reserva, aumentando a concentração total de proteínas nos grãos, mesmo na ausência de fertilização com Se. No entanto, quando aplicado em conjunto com a citocinina, o Se aumentou a concentração de aminoácidos nos grãos de arroz em comparação com grãos de plantas tratadas apenas com citocinina ou Se. Além disso, a citocinina exerceu um forte efeito inibitório na absorção e acumulação de micronutrientes nas raízes e grãos de arroz, e esse efeito não foi revertido pela fertilização com Se. No entanto, a absorção e o acúmulo de Se nos grãos de arroz são mantidos, mesmo em presença de citocinina. Este estudo abre novas perspectivas para pesquisas futuras sobre o papel das citocininas e do Se no desenvolvimento e na qualidade dos grãos de arroz.

Palavras-chave: Alometria; Hormônio; Minerais; Selenito de sódio.

ABSTRACT

Cytokinin and selenium (Se) can modulate the production and modify the nutritional composition of rice grains. However, it is not clear how the combined application of cytokinin and Se affects yield, filling, and the nutritional quality of rice grains. In the present study, cytokinin improved grain filling and rice yield parameters regardless of Se availability. However, cytokinin reduced root biomass, even in Se-treated plants. On the other hand, cytokinin increased the net photosynthesis rate during the early grain filling stage, enhancing the leaves' capacity to produce assimilates to support grain development. Remarkably, cytokinin altered the composition of reserve proteins, increasing the total protein concentration in grains, even in the absence of Se fertilization. However, when applied together with cytokinin, Se increased the amino acid concentration in rice grains compared to grains from plants treated only with cytokinin or Se. Additionally, cytokinin exerted a strong inhibitory effect on the absorption and accumulation of micronutrients in rice roots and grains, and this effect was not reversed by Se fertilization. However, Se absorption and accumulation in rice grains are maintained, even in the presence of cytokinin. This study opens new perspectives for future research on the role of cytokinins and Se in the development and quality of rice grains.

Keywords: Allometry; Hormone; Minerals; Sodium selenite.

1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) tem um papel vital na alimentação e subsistência de mais da metade da população global (Zhang et al., 2021). Assim, o crescimento acelerado da população mundial combinado ao desenvolvimento econômico tem gerado uma crescente demanda por aumentos na produção de arroz (Panda et al., 2018). Entretanto, a otimização do rendimento de grãos deve ser feita mantendo a qualidade nutricional dos alimentos, visto que a desnutrição por micronutrientes, particularmente o selênio (Se), afeta mais da metade da população em países em desenvolvimento (Jameson e Song, 2015; Gao et al., 2019). Portanto, aprimorar o rendimento de grãos e a qualidade nutricional desse cereal é fundamental para garantir a segurança alimentar global (Shah et al., 2023). Diversos estudos tem relatado a aplicação de citocininas como estratégia de gerenciamento do aumento do rendimento de grãos em cereais, especialmente em arroz, trigo e milho (Zhang et al., 2021; Islam et al., 2021; Hosseini et al., 2022). Todavia, um efeito significativo das citocininas é a inibição da atividade dos transportadores de nutrientes, podendo comprometer a absorção de nutrientes pelas raízes de arroz e a concentração de minerais nos grãos (Gao et al., 2019). Por outro lado, a suplementação de plantas com Se pode melhorar os componentes de rendimento do arroz bem como otimizar as características nutricionais de grãos de arroz (Boldrin et al., 2013; Reis et al., 2020; Teixeira et al., 2021). No entanto pouco se sabe como a aplicação combinada de citocininas e o fornecimento de Se afeta o rendimento e a qualidade nutricional de grãos de arroz.

A citocinina é um hormônio vegetal que desempenha importante papel em diversos processos do crescimento e desenvolvimento vegetal, incluindo o desenvolvimento da parte aérea e o controle do processo de divisão celular (Panda et al., 2018; Pavlů et al., 2018; Wang et al., 2020). Além disso, as citocininas controlam o perfilhamento, as relações fonte e dreno, a arquitetura da panícula, o rendimento de grãos de arroz e a resposta aos nutrientes (Peleg et al., 2011; Wang et al., 2020; Chen et al., 2023). O rendimento de grãos é determinado pelo número de grãos por panícula, pelo número de grãos por planta e pela biomassa de grãos (Peleg et al., 2011; Li et al., 2013). Durante o desenvolvimento da panícula, o meristema da inflorescência é crucial na determinação do número de grãos e reduções na sua atividade podem reduzir o número de ramificações da panícula e a produção de grãos. Neste sentido, aumentos nos níveis de citocininas estão associados a um aumento na atividade do meristema da inflorescência do arroz aumentando o número de órgãos reprodutivos e resultando em maior produção de grãos (Li et al., 2013). Por exemplo, foi observado que reduções nos níveis de *OsCKX2*, uma oxidase de citocinina, gera acúmulo de citocininas nas inflorescências aumentando o número de órgãos

reprodutivos, melhorando conseqüentemente o rendimento de grãos (Koprna et al., 2016; Guo et al., 2020; Zhang et al., 2021).

Além disso, o enchimento de grãos é uma etapa fundamental para a formação do rendimento do arroz (Chen et al., 2023). O rendimento de grãos do arroz é influenciado, em grande parte, pelas relações fonte e dreno, nas quais as espiguetas são os principais drenos de fotoassimilados enquanto as folhas superiores e a folha bandeira são a fonte primária de carboidratos (Peleg et al., 2011). Neste contexto, as citocininas modulam a força e o tamanho do dreno mediando a divisão celular e o aumento no número de células do endosperma, controlando, assim, a exportação de fotoassimilados para os drenos (Javid et al., 2011). No entanto, os grãos de arroz apresentam enchimento assíncrono a depender da sua posição na panícula. Os grãos inferiores das panículas apresentam uma taxa de enchimento mais lenta, menor capacidade de obter fotoassimilados e menor enriquecimento do endosperma em relação aos grãos superiores (Chen et al., 2022). Neste contexto, a aplicação de citocininas em plantas pode regular negativamente a expressão CKX e positivamente a expressão de genes do ciclo celular em grãos inferiores de panículas de arroz, melhorando significativamente o enchimento de grãos (Panda et al., 2018).

A aplicação de citocininas em plantas de arroz pode também aumentar a atividade da fonte para melhorar o enchimento de grãos inferiores de panículas de arroz (Zhang et al., 2010). Neste contexto, a disponibilidade de Se e aumentos nos níveis de citocininas nas plantas podem melhorar a taxa assimilação líquida de CO₂, a transpiração nas folhas e a produção de açúcares (Zhang et al., 2014; Pavlů et al., 2018; Das et al., 2019; Malheiros et al., 2020; Wang et al., 2020). Adicionalmente, elevações nos níveis endógenos de citocininas podem regular positivamente a biossíntese e o transporte de sacarose, amido e proteínas em grãos de arroz (Chen et al., 2022). O amido é o principal componente do endosperma da semente de arroz e sua biossíntese é um processo crucial para a formação do rendimento de grãos. Assim, enzimas importantes para a biossíntese de sacarose e amido como a sacarose sintase (SuSy), a adenosina difosfato glicose pirofosforilase (AGPase) e a sintase do amido (StS) em grãos inferiores de panículas de arroz podem ter sua atividade modulada pela aplicação de citocininas e estão positivamente correlacionadas a aumento na atividade do dreno e do enchimento de grãos (Chen et al., 2023). Embora o Se e as citocininas apresentem efeitos sobre o metabolismo primário de plantas de arroz, ainda não está claro como o Se em conjunto com a citocinina influenciam a produção de fotoassimilados e o enchimento de grãos de plantas de arroz.

No que diz respeito a qualidade nutricional de grãos de arroz, o Se apresenta uma certa flexibilidade para modificar a composição nutricional de grãos de arroz. Por exemplo, a

suplementação de plantas de arroz com 10 μM de selenito de sódio aumentou as concentrações de N, Ca, Fe, Se e proteínas enquanto houve uma tendência de reduzir as concentrações de Mn, Cu, Zn nos grãos de arroz com o aumento na concentração da adubação nitrogenada (Teixeira et al., 2021). As citocininas, por sua vez, atuam nas respostas de aquisição de nutrientes em plantas e regulam negativamente a expressão de diversos transportadores de minerais como Zn, Si, Mn, B, Cu, K e Mg em plantas de arroz (Gao et al., 2019). Além disso, as citocininas regulam negativamente a tolerância ao selenito em *Arabidopsis thaliana*. Mutantes deficientes na biossíntese de citocininas apresentam a expressão de genes de transportadores de Pi da família PHT reduzida (Jiang et al., 2019). Um menor nível de expressão destes transportadores reduziu a absorção e acúmulo de Se no *Arabidopsis*. Assim, os efeitos inibitórios da deficiência de citocininas na expressão de transportadores de Pi e no acúmulo de Se foram revertidos pela aplicação de citocininas (Jiang et al., 2019). O Se é absorvido pelas raízes das plantas de arroz principalmente nas formas de selenito e selenato. A absorção de selenito é majoritariamente mediada por transportadores de Pi, *OsPT2*, e por transportadores de influxo de silício, *OsNIP2.1* (Zhao et al., 2010; Zhang et al., 2014). O selenato, por sua vez, é absorvido por transportadores de sulfato, *OsSULTR1.2* (Liang et al., 2019). Além disso, *OsNRT1.1B*, um transportador relacionado a absorção de nitrato, aumenta a absorção de Se orgânico pelas raízes de plantas de arroz (Zhang et al., 2019). No entanto, ainda permanece incompreendido como níveis de citocinina podem afetar a expressão de *OsPT2*, *OsNIP2.1* e *OsSULTR1.2* para modular a captação de Se pelas raízes e o acúmulo de Se nos grãos de arroz.

Neste capítulo, testou-se a hipótese de que a absorção e o transporte de nutrientes minerais pelas raízes de arroz são modificados pela aplicação de Se e citocinina nas plantas, regulando, assim, a composição nutricional de grãos de arroz em termos de produtos de reserva e micronutrientes. Adicionalmente, avaliou-se o efeito da aplicação de citocinina sobre a absorção e acúmulo de Se no grão. Também foi avaliado o efeito da aplicação de Se e citocinina no enchimento e na produção de grãos de arroz, uma vez que a variação nos níveis de citocininas e a disponibilidade de Se durante a estação de crescimento das plantas pode modificar a produção e a alocação de fotoassimilados afetando o crescimento vegetativo e reprodutivo do arroz.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e condições de cultivo

Sementes de arroz (*Oryza sativa* L. ssp *japonica* cv Oochikara) foram obtidas de plantas cultivadas em casa de vegetação em Viçosa (20° 45'S, 42° 54'W, 650 m altitude), Minas Gerais, Brasil. A germinação das sementes e o crescimento inicial das plântulas foi feito conforme descrito por Malheiros et al. (2020). Em seguida, as plântulas foram cultivadas em vasos plásticos de 10 L de capacidade, contendo uma mistura 1:1 (v/v) de substrato comercial (Tropstrato HT, Mogi Mirim, Brasil) e solo. Todos os vasos foram preenchidos com 7,5 kg de solo experimental (com base no peso seco). As características químicas do solo experimental estão descritas na Tabela S1. As plantas de arroz foram mantidas até o final do ciclo em casa de vegetação com temperatura do ar controlada (30/25 °C, dia/noite) e iluminação natural. Durante a primeira semana as plantas foram irrigadas diariamente até atingir a capacidade de campo. Após a primeira semana, as plantas foram tratadas com: 0 µM de selenato de sódio + 0 µM de benziladenina (controle), 0 µM de selenato de sódio + 50 µM de benziladenina, 10 µM de selenato de sódio + 0 µM de benziladenina, 10 µM de selenato de sódio + 50 µM de benziladenina. A solução de selenato de sódio (500 mL) foi aplicada semanalmente no substrato de cultivo das plantas e a solução de benziladenina foi pulverizada uniformemente na parte aérea das plantas quinzenalmente ao longo do experimento. Nos demais dias da semana a irrigação foi feita normalmente até atingir a capacidade de campo do substrato de cultivo.

2.2 Parâmetros produtivos

Para a determinação dos parâmetros produtivos, as plantas foram coletadas ao final do ciclo e separadas em raízes, colmos, folhas e grãos. Os tecidos das plantas foram submetidos à secagem em estufa a 70°C com circulação forçada de ar, até atingir peso constante. Com base no valor de biomassa seca, obtido para cada uma das diferentes partes, foram estimados os parâmetros agrônômicos: biomassa seca de raízes, colmos, folhas e grãos bem como a biomassa total e a razão raiz/parte aérea. Determinou-se, também, o índice de colheita, o número de grãos de cada panícula, o número de perfilhos por planta, número de panículas por planta, número de ramificações primárias, número de grãos por planta, porcentagem de grãos cheios e peso de mil grãos.

2.3 Trocas gasosas

Parâmetros de trocas gasosas como a taxa de assimilação líquida de carbono (A), a condutância estomática (g_s), a concentração subestomática de CO_2 (C_i) e a taxa transpiratória (E), foram determinados com um analisador de gases a infravermelho (Li 6400XT, Li-Cor, Lincoln, NE, USA). As avaliações de trocas gasosas foram realizadas entre 09:00 e 11:00 h sob radiação fotossinteticamente ativa (RFA) de $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e $410 \mu\text{mol de CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$, nas folhas bandeira na fase de enchimento de grãos. Todas as medições foram realizadas em condições ambientes de temperatura e DPV.

2.4 Análise mineral

A análise dos minerais foi realizada nos tecidos da raiz e dos grãos maduros de plantas de arroz. Para isso, cerca de cem grãos de cada tratamento foram selecionados das sementes produzidas de forma aleatória e descascados. Os grãos e amostras de raízes de arroz foram secos em estufa, a $60 \text{ }^\circ\text{C}$, até atingir peso constante e depois foram armazenados em sacos ziplock até a análise. Após secagem, os grãos e as raízes foram triturados em moinho do tipo Willey (CINELAB CE-430; 8 lâminas, 1725 rpm, peneira de 20 mesh). As amostras (500 mg) foram submetidas a digestão nitro-perclórica (10:1, v/v) e analisadas quanto à concentração de P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe, Mn e Zn usando um espectrofotômetro de emissão ótica em plasma induzido (ICP-OES, Perkin-Elmer, Shelton, CT) conforme descrito por Wheal et al. (2011). A concentração de N nos grãos e nas raízes foram determinadas conforme o método de combustão de (Muñoz-Huerta et al., 2013). A concentração de Se nos grãos e nas raízes foi determinada conforme El Mehdawi et al. (2018).

2.5 Análises bioquímicas e pigmentos

Grãos inferiores de panículas de arroz na fase inicial do enchimento foram coletadas 6 dias após a antese, no final do período de luz, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas. Cerca de 50 mg de amostra fresca macerada foram utilizados para quantificar açúcares solúveis, amido, proteínas totais e aminoácidos. As análises bioquímicas nos grãos maduros das plantas de arroz foram realizadas nas mesmas amostras utilizadas para determinação mineral por ICP-OES. A quantificação dos açúcares solúveis, amido e aminoácidos totais foi realizada conforme Cross et al. (2006), utilizando 50 mg de grãos maduros moídos.

A extração e a quantificação das proteínas de reserva (albumina, prolamina, globulina e glutelina) e proteínas totais dos grãos maduros foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Reis et al. (2020), utilizando 100 mg de grãos moídos.

Os teores foliares de clorofilas *a* e *b* e de carotenóides foram determinados por meio de extratos obtidos após a maceração de 10 discos de folhas bandeira de 3,7 mm de diâmetro utilizando-se de acetona 80%, conforme Lichtenthaler (1987).

2.6 Análise estatística

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado com 4 tratamentos em esquema fatorial (2 x 2) composto por dois níveis de citocinina e dois níveis de Se com quatro repetições cada. A unidade experimental do experimento foi composta por quatro plantas por vaso. Todos os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas pelo teste Tukey ($P < 0,05$), utilizando o software estatístico R.

3 RESULTADOS

3.1 A citocinina modula o acúmulo de biomassa e a produção de arroz de forma independente da disponibilidade de Se

As plantas de arroz tratadas com citocinina apresentaram maior número de ramificações primárias em suas panículas, em relação as plantas não pulverizadas com citocinina (Figura 1a, b). Todavia, o número de ramificações primárias das panículas não foi alterado pelo fornecimento de Se (Figura 1a, b). As plantas pulverizadas com citocinina não suplementadas com Se apresentaram aumento de 20% no número de grãos por panícula em relação as plantas do controle. Já as plantas pulverizadas com citocinina e suplementadas com Se apresentaram aumento de 37% no número de grãos por panícula em relação as plantas suplementadas apenas com Se. Por outro lado, a suplementação das plantas de arroz com Se reduziu o número de grãos por panícula em relação as plantas não tratadas com Se (Figura 1c). A interação citocinina x Se não foi significativa para os níveis de açúcares e amido nos grãos. Observou-se ainda que plantas tratadas somente com citocinina apresentaram um incremento de 19% no número de grãos por planta em relação as plantas do controle. Enquanto as plantas pulverizadas com citocinina e suplementadas com Se apresentaram um aumento de 54% no número de grãos por planta em relação as plantas tratadas somente com Se. Adicionalmente, não foi observado efeito

significativo do selênio no número de grãos por planta, em relação as plantas não tratadas com Se (Figura 1d). As plantas tratadas somente com citocinina não apresentaram alteração no peso de mil grãos em relação as plantas do controle. Entretanto, as plantas tratadas com citocinina em conjunto com Se apresentaram peso de mil grãos superior em relação as plantas tratadas apenas com Se. Observou-se ainda que o Se elevou o peso de mil grãos das plantas pulverizadas com citocinina, em relação as plantas tratadas somente com citoninina. O Se sozinho não alterou o peso de mil grãos em relação as plantas do controle (Figura 1e). As plantas tratadas somente com citocinina apresentaram aumento de 11% no índice de colheita em relação as plantas do controle. As plantas pulverizadas com citocinina e suplementadas com Se apresentaram aumento de 17% no índice de colheita em relação as plantas suplementadas apenas com Se. Por outro lado, a suplementação das plantas de arroz com Se não alterou o índice de colheita, em relação as plantas não tratadas com Se (Figura 1f). A aplicação de citocininas nas plantas também alterou a produção de biomassa das plantas de arroz. Observou-se que as plantas tratadas apenas com citocinina apresentaram um incremento de 24% na biomassa de grãos em relação as plantas do controle. Já as plantas pulverizadas com citocinina e suplementadas com Se apresentaram aumento de 45% na biomassa de grãos em relação as plantas fertilizadas apenas com Se. Entretanto, a suplementação das plantas de arroz com Se não alterou a biomassa de grãos produzida, em relação as plantas não tratadas com Se (Figura 1g). O tratamento com citocinina não alterou significativamente o número de panículas por planta, em relação as plantas não pulverizadas com citocinina. Adicionalmente, o Se não alterou significativamente o número de panículas por planta em relação as plantas do controle. Entretanto, observou-se um aumento de 20% no número de panículas por planta no tratamento com citocinina em conjunto com Se, em relação as plantas pulverizadas apenas com citocinina. Além disso, a porcentagem de grãos cheios das plantas de arroz não foi alterada pelos tratamentos (Figura S1).

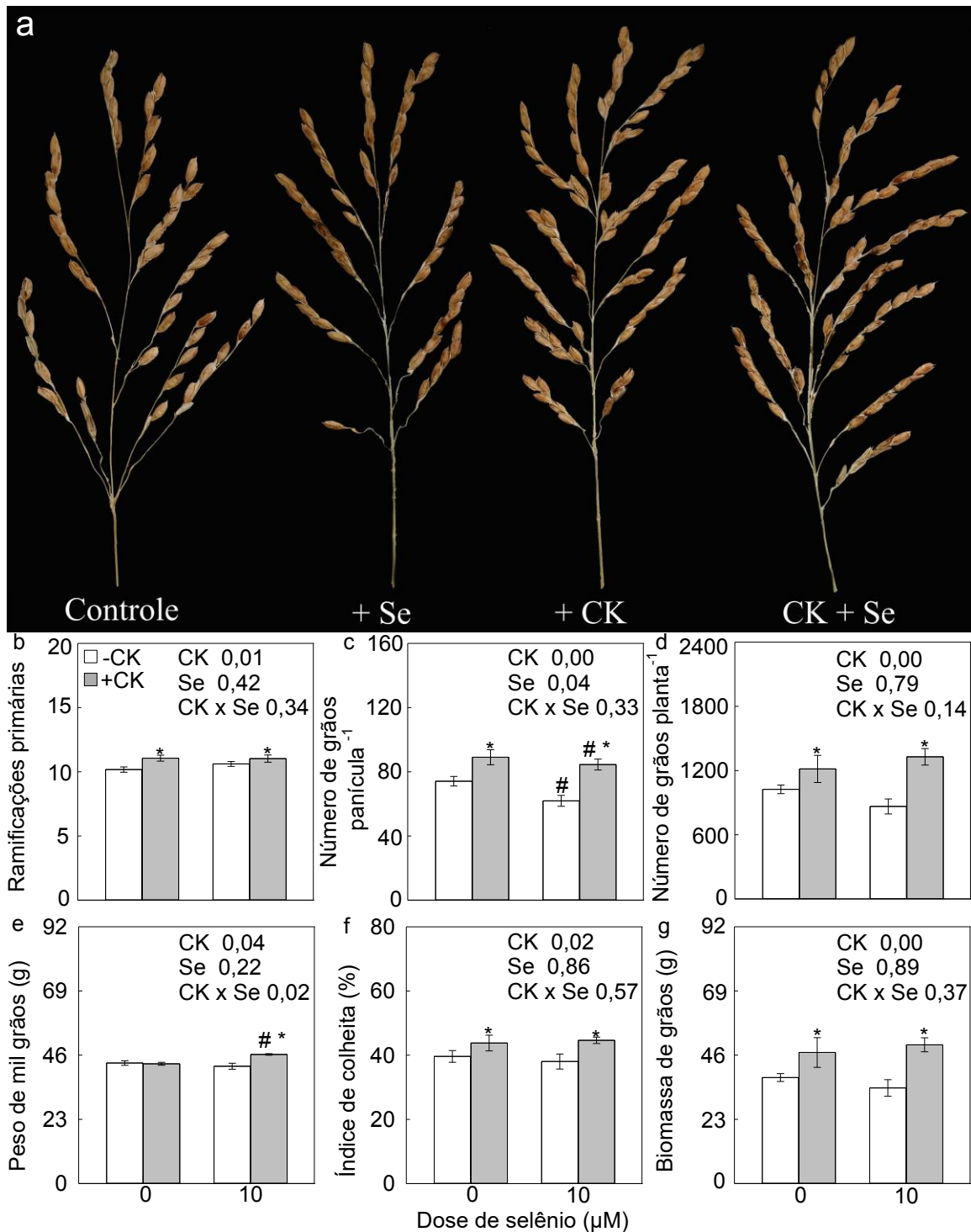


Figura 1. Efeito dos tratamentos com Se e citocinina, isolados ou em combinação, nos parâmetros de rendimento de grãos de plantas de arroz. **a.** Imagem das panículas das plantas de arroz. **b.** Número de ramificações primárias por panícula **c.** Número de grãos por panícula **d.** Número de grãos por planta **e.** Peso de mil grãos **f.** Índice de colheita **g.** Biomassa de grãos. Asteriscos representam diferença estatística entre os tratamentos com citocinina dentro da mesma condição de Se. Hashtags representam diferença estatística entre os tratamentos com Se dentro da mesma condição de citocinina. Teste Tukey ($P < 0,05$). Médias de quatro repetições \pm erro da média.

As plantas tratadas somente com citocinina apresentaram aumento de 51% no número de perfilhos por planta em relação as plantas do controle. Já as plantas tratadas com citocinina mais Se apresentaram aumento de 58% no número de perfilhos por planta em relação as plantas fertilizadas apenas com Se. É interessante notar ainda que as plantas tratadas com citocinina mais Se apresentaram uma tendência de aumento no número de perfilhos em relação as plantas tratadas somente com citocinina. Por outro lado, a suplementação das plantas de arroz com Se não alterou o número de perfilhos por planta, em relação as plantas não tratadas com Se (Figura 2a). Adicionalmente, a aplicação de citocinina no arroz aumentou a biomassa de colmos e a biomassa total das plantas em relação as plantas não tratadas com citocininas. Todavia, o Se não alterou significativamente esses parâmetros de crescimento (Figura 2b, h). A aplicação de citocinina isolada ou em combinação com Se não alterou a biomassa de folhas. Por outro lado, a biomassa de folhas foi incrementada nas plantas tratadas com Se em relação as plantas não suplementadas com Se (Figura 2c). Entretanto, a biomassa da parte aérea não foi alterada significativamente pelos tratamentos (Figura 2d). A citocinina reduziu a área foliar específica em relação as plantas não tratadas com citocinina. Todavia, a fertilização das plantas com Se não alterou significativamente a área foliar específica das plantas de arroz (Figura 2e). Ao contrário do que se observou na parte aérea, o tratamento das plantas com citocinina e a suplementação das plantas com Se, isoladamente, reduziu a biomassa do sistema radicular e a razão raiz/parte aérea em relação as plantas do controle. Em contrapartida, o tratamento das plantas com citocinina combinada com Se não alterou a biomassa de raízes e a razão raiz/parte aérea das plantas de arroz em relação as plantas tratadas somente com citocinina ou Se (Figura 1f,g).

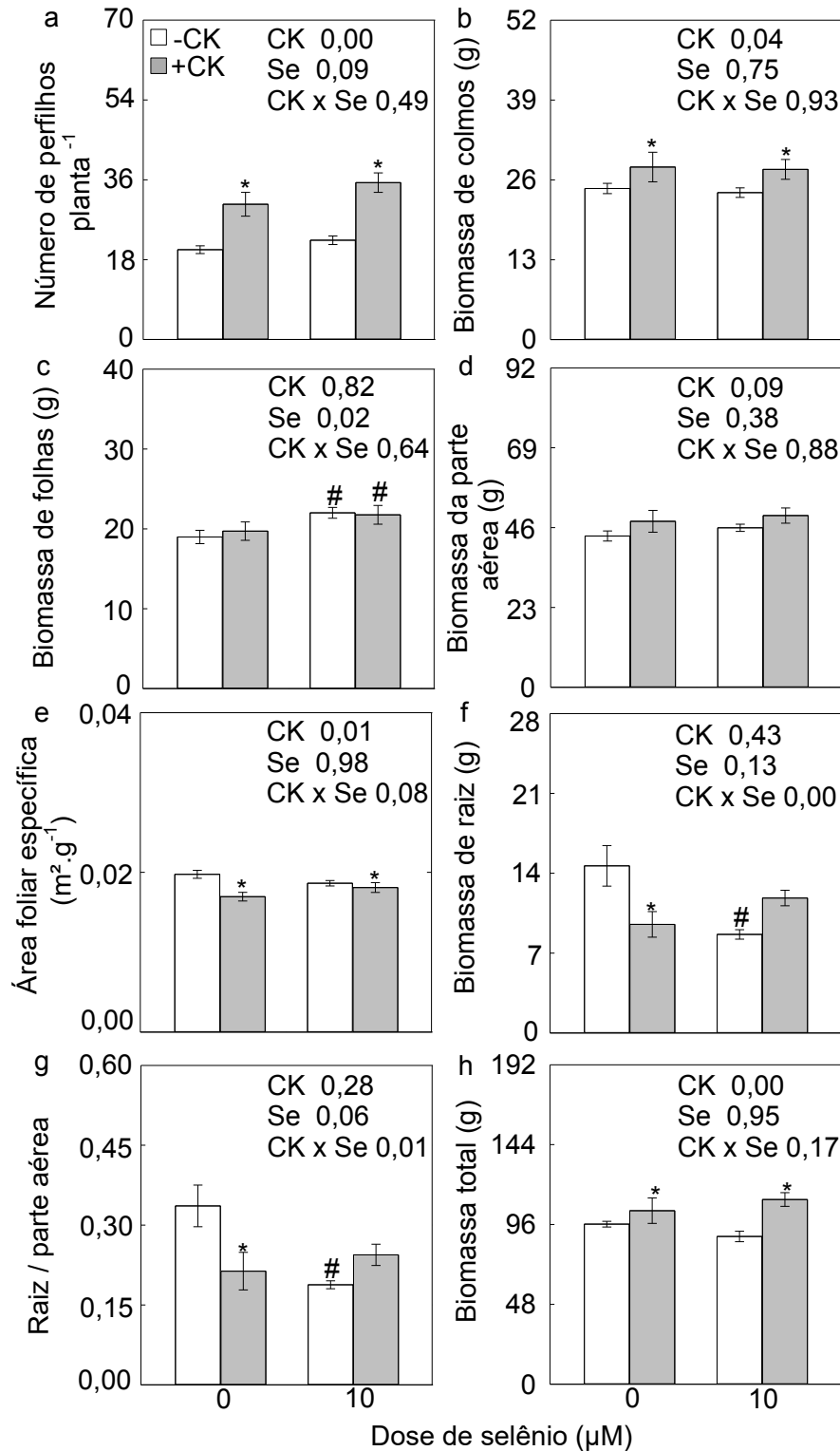


Figura 2. Efeito dos tratamentos com Se e citocinina, isolados ou em combinação, na produção de biomassa de plantas de arroz. **a.** Número de perfilhos **b.** Biomassa de colmos **c.** Biomassa de folhas **d.** Biomassa da parte aérea **e.** Área foliar específica **f.** Biomassa de raízes **g.** Razão raiz e parte aérea **h.** Biomassa total. Asteriscos representam diferença estatística entre os tratamentos com citocinina dentro da mesma condição de Se. Hashtags representam diferença estatística entre os tratamentos com Se dentro da mesma condição de citocinina. Teste Tukey ($P < 0,05$). Médias de quatro repetições \pm erro da média.

3.2 A aplicação de citocinina incrementa a fotossíntese líquida e modula o acúmulo de fotoassimilados em grãos inferiores de panículas de arroz no início do enchimento de grãos

As plantas tratadas somente com citocinina apresentaram aumento de 20% na fotossíntese líquida em relação as plantas do controle. O tratamento com citocinina mais Se aumentou em 21% a fotossíntese líquida do arroz, quando comparado as plantas suplementadas apenas com Se. Por outro lado, o Se por si só não alterou a fotossíntese líquida das plantas de arroz (Figura 3a). Comportamento semelhante foi observado para as taxas transpiratórias das plantas de arroz. As plantas pulverizadas com citocinina apresentaram acréscimo nas taxas transpiratórias em relação as plantas não tratadas com citocinina. O Se não alterou significativamente a transpiração das plantas de arroz (Figura 3b). Por outro lado, as concentrações de clorofilas e carotenoides não foram alteradas pelo tratamento das plantas com citocinina. As plantas tratadas com Se apresentaram maior concentração dos pigmentos fotossintéticos nas folhas em relação as plantas não fertilizadas com Se (Figura 3c, d). Para avaliar como o Se e a citocinina afetam o enchimento de grãos de arroz, as concentrações de açúcares solúveis e amido foram quantificadas em grãos inferiores de panículas de arroz coletadas 6 dias após a antese das inflorescências. Observou-se que a aplicação de citocininas isoladamente aumentou o conteúdo de açúcares solúveis em 21% e de amido em 68% nos grãos em relação ao controle. Adicionalmente, a citocinina em conjunto com o Se aumentou a concentração de açúcares solúveis (25%) e de amido (87%) nos grãos em enchimento em relação ao tratamento apenas com Se. Entretanto, o Se não alterou as concentrações de açúcares solúveis e amido nos grãos em enchimento, quando comparado com os grãos das plantas não tratadas com Se (Figura 3e,f).

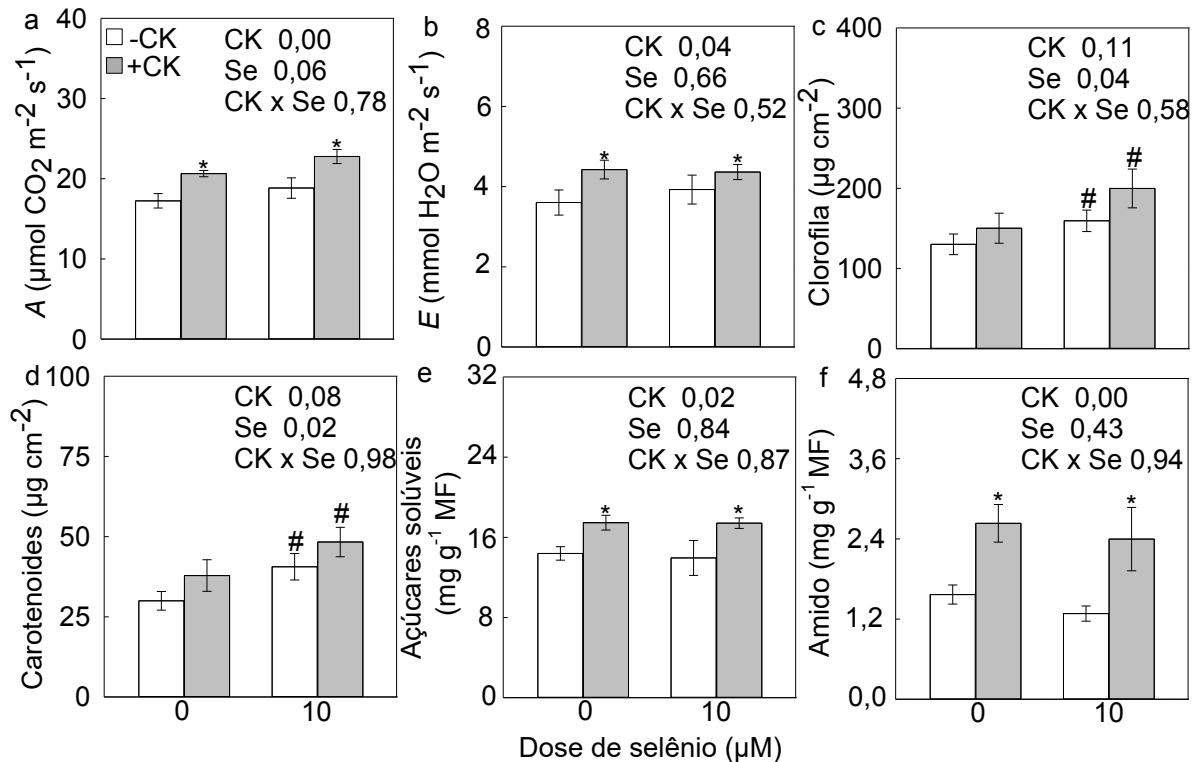


Figura 3. Efeito dos tratamentos com Se e citocinina, isolados ou em combinação, nas trocas gasosas e nas concentrações de pigmentos nas folhas bandeira bem como no acúmulo de açúcares e amido nos grãos inferiores de panículas de arroz aos 6 dias após a antese. **a.** Taxa de assimilação líquida de CO_2 . **b.** Taxa de transpiração. **c.** Clorofila total. **d.** Carotenóides. **e.** Açúcares solúveis. **f.** Amido. Asteriscos representam diferença estatística entre os tratamentos com citocinina dentro da mesma condição de Se. Hashtags representam diferença estatística entre os tratamentos com Se dentro da mesma condição de citocinina. Teste de Tukey ($P < 0,05$). Médias de quatro repetições \pm erro da média.

3.3 Efeitos do Se e da citocinina na composição nutricional dos grãos maduros de arroz

A concentração de açúcares solúveis em grãos de arroz completamente desenvolvidos não foi alterada pela citocinina ou pela fertilização com Se (Figura 4a). Entretanto, a citocinina reduziu a concentração de amido nos grãos, quando comparado com os grãos das plantas não tratadas com citocinina. Por outro lado, a concentração de amido nos grãos não foi alterada pela suplementação das plantas com Se (Figura 4b). Os grãos das plantas tratadas com citocinina apresentaram maior concentração de aminoácidos em relação aos grãos das plantas não tratadas com citocinina. De forma semelhante, as plantas suplementadas com Se apresentaram maior concentração de aminoácidos totais nos grãos em relação os grãos das plantas não tratadas com Se. Observou-se ainda que as plantas tratadas simultaneamente com citocinina e Se apresentaram um incremento na concentração de aminoácidos nos grãos em relação aos grãos das plantas tratadas apenas com citocinina ou Se (Figura 4c).

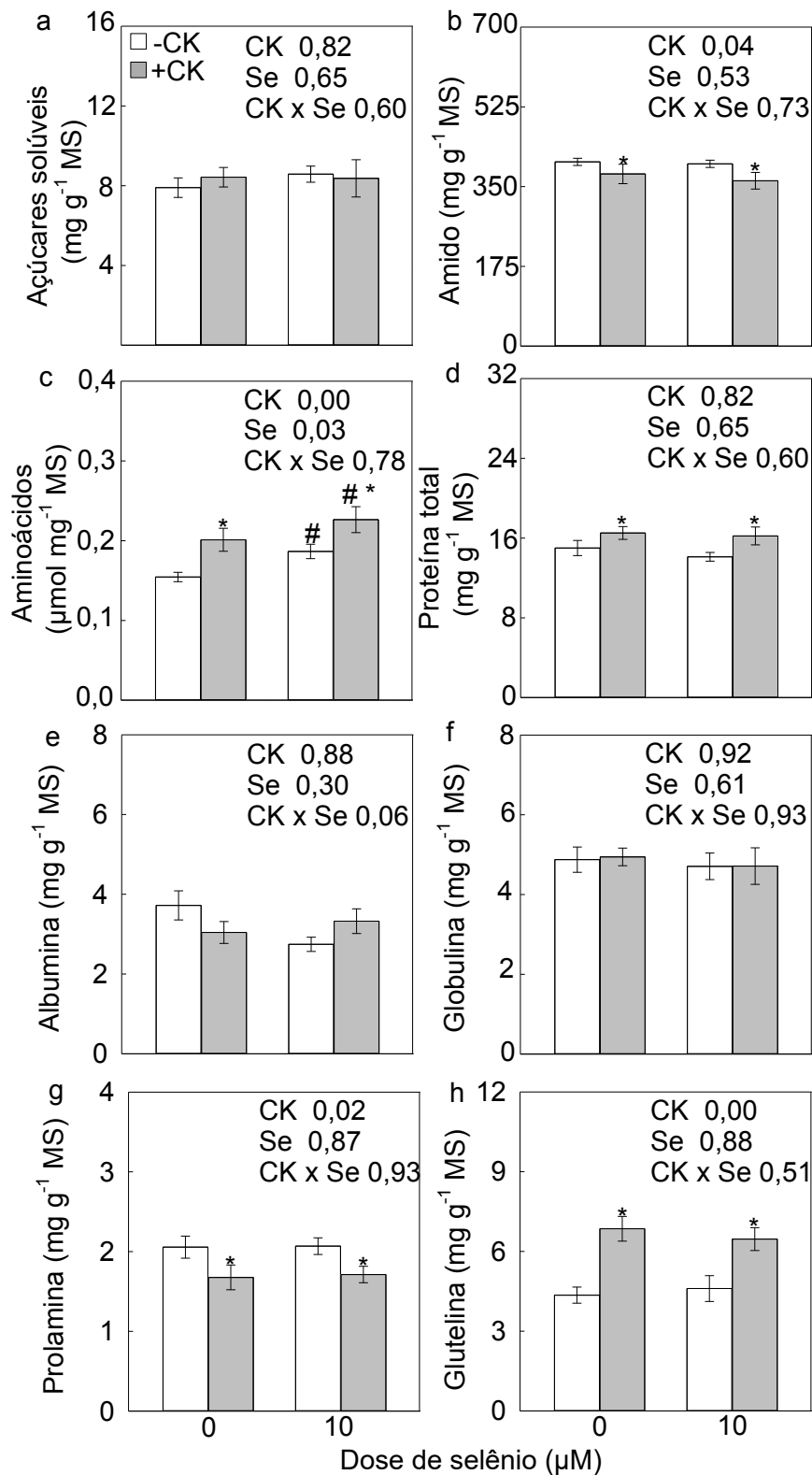


Figura 4. Efeito dos tratamentos com Se e citocininas, isolados ou em combinação, na no acúmulo de produtos de reserva dos grãos de arroz. **a.** Açúcares solúveis **b.** Amido **c.** Aminoácidos livres totais **d.** Proteína solúvel total **e.** Albumina **f.** Globulina **g.** Prolamina **h.** Glutelina. Asteriscos representam diferença estatística entre os tratamentos com citocinina dentro da mesma condição de Se. Hashtags representam diferença estatística entre os tratamentos com Se dentro da mesma condição de citocinina. Teste de Tukey ($P < 0,05$). Médias de quatro repetições \pm erro da média.

A aplicação de citocinina nas plantas resultou em um aumento na concentração de proteína solúvel total, especificamente associada com um aumento na concentração de glutelina e redução na concentração de prolamina nos grãos em relação aos grãos das plantas não tratadas com citocinina. Por outro lado, as concentrações de proteínas totais, glutelina e prolamina não foram alteradas pela fertilização das plantas com Se (Figura 4d, g, h). As concentrações de albumina e globulina nos grãos de arroz não foram alteradas pela pulverização das plantas com citocinina ou pela adição de Se (Figura 4e, f).

3.4 A citocinina afeta a absorção e a alocação de elementos minerais para as sementes independentemente da disponibilidade de selênio no solo

A aplicação de citocinina e a suplementação com Se, isoladas ou em combinação, não alteraram significativamente as concentrações de N, Mg e Ca nos tecidos das raízes de plantas de arroz (Figuras 5a, b, c). A pulverização das plantas com citocinina não alterou significativamente a concentração de S nas raízes de arroz, em relação as raízes das plantas não tratadas com citocinina. Entretanto, o Se aumentou a concentração de S nos tecidos das raízes de arroz, em relação as plantas não suplementadas com Se (Figura 5d). As raízes das plantas tratadas com citocininas apresentaram concentrações de P e K mais elevada em relação as raízes das plantas não suplementadas com citocininas (Figura 5e, f). No entanto, o Se não alterou as concentrações de P e K nas raízes, quando comparado com as raízes das plantas não tratadas com Se (Figura 5e, f).

Com relação aos micronutrientes, observou-se a citocinina reduziu as concentrações de Fe, Mn, B, Cu e Zn nos tecidos das raízes em relação as plantas não tratadas com citocininas. Por outro lado, a suplementação das plantas com Se aumentou a concentração de Fe nas raízes em relação ao controle, mas não alterou as concentrações de Mn, B, Cu e Zn nas raízes em relação as plantas não tratadas com Se (Figura 5g-k). A citocinina não afetou as concentrações de Se nos tecidos das raízes das plantas de arroz. Todavia, a suplementação das plantas com Se promoveu um incremento na concentração de Se nos tecidos das raízes de plantas de arroz em relação as raízes das plantas não tratadas com Se (Figura 5l).

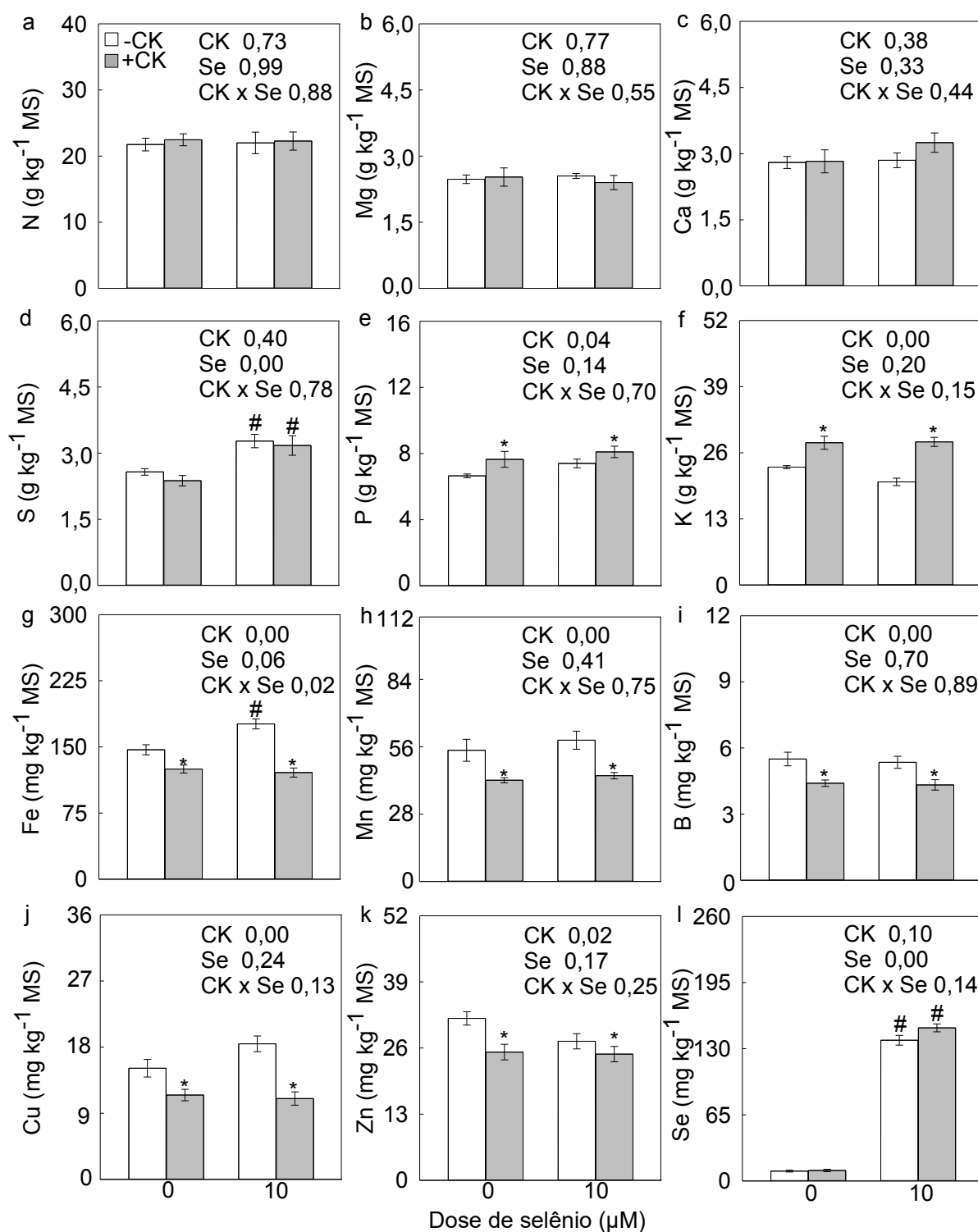


Figura 5. Efeito dos tratamentos com Se e citocininas, isolados ou em combinação, na composição mineral das raízes de arroz. **a.** Nitrogênio **b.** Magnésio **c.** Enxofre **d.** Cálcio **e.** Fósforo **f.** Potássio **g.** Ferro **h.** Manganês. **i.** Boro **j.** Cobre **k.** Zinco **l.** Selênio. Asteriscos representam diferença estatística entre os tratamentos com citocinina dentro da mesma condição de Se. Hashtags representam diferença estatística entre os tratamentos com Se dentro da mesma condição de citocinina. Teste Tukey ($P < 0,05$). Médias de quatro repetições \pm erro da média.

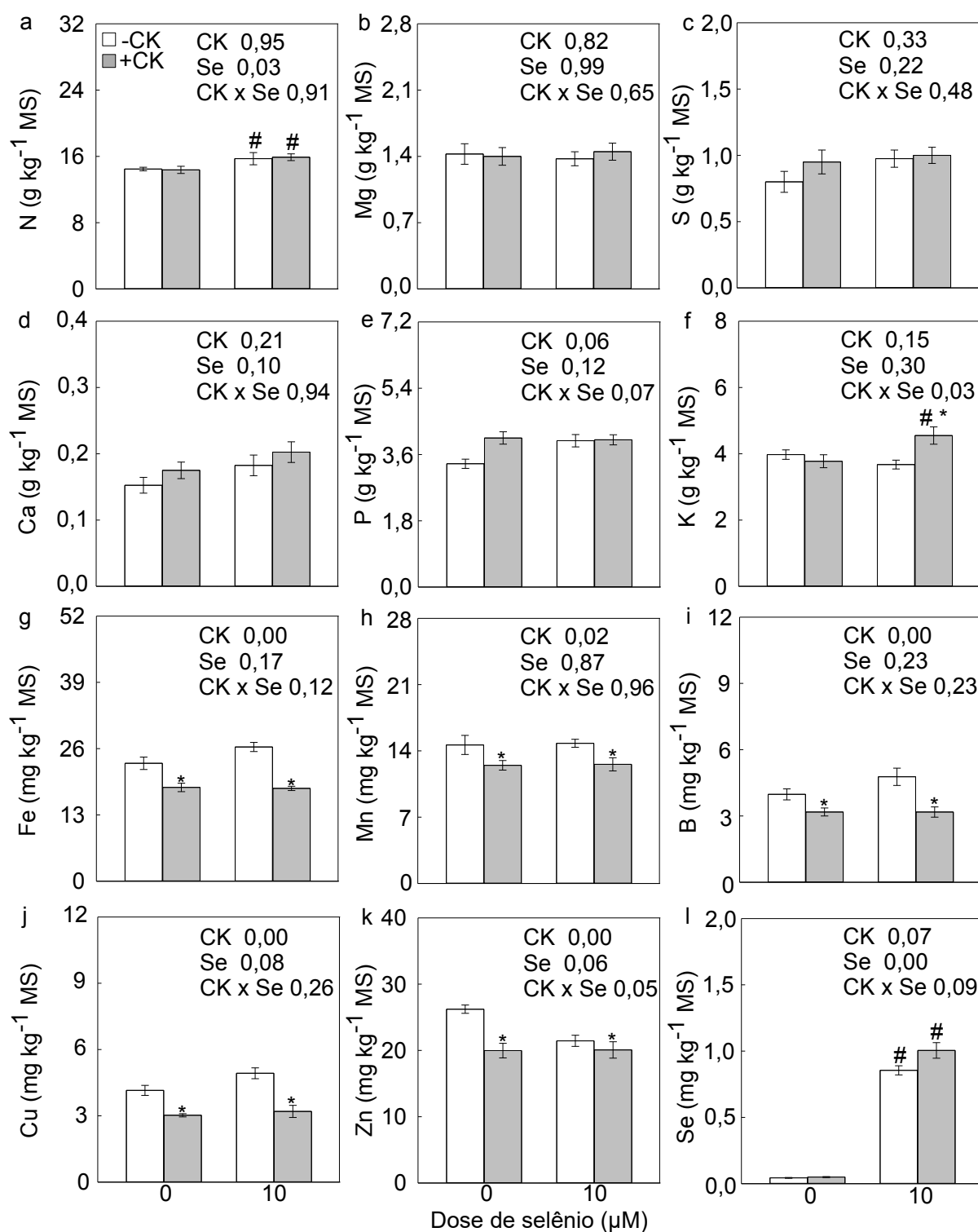


Figura 6. Efeito dos tratamentos com Se e citocininas, isolados ou em combinação, na composição mineral dos grãos de arroz. **a.** Nitrogênio **b.** Magnésio **c.** Enxofre **d.** Cálcio **e.** Fósforo **f.** Potássio **g.** Ferro **h.** Manganês. **i.** Boro **j.** Cobre **k.** Zinco **l.** Selênio. Asteriscos representam diferença estatística entre os tratamentos com citocinina dentro da mesma condição de Se. Hashtags representam diferença estatística entre os tratamentos com Se dentro da mesma condição de citocinina. Teste Tukey ($P < 0,05$). Médias de quatro repetições \pm erro da média.

4 DISCUSSÃO

Em arroz, a aplicação de citocininas melhora o crescimento e o desenvolvimento das plantas e regula positivamente o rendimento de grãos de arroz (Tao et al., 2020; Wang et al., 2020). Embora o Se, em baixas concentrações seja considerado um elemento benéfico as plantas, seus efeitos sobre a produção de grãos de arroz são menos pronunciados (Teixeira et al., 2021). Alguns estudos têm relatado uma melhoria nas taxas fotossintéticas e no acúmulo de biomassa em resposta a aplicação de Se e que isso pode estar relacionado ao aumento da produção de grãos de plantas de arroz (Zhang et al., 2014; Luo et al., 2019). Entretanto, no presente estudo foi demonstrado que o efeito da citocinina no desenvolvimento vegetativo e na produção de grãos de arroz é independente da fertilização com Se. Níveis mais elevados de citocininas estimulam o crescimento e a ramificação da parte aérea (Zhang et al., 2021). Além disso, os níveis de citocininas nos tecidos do arroz são fatores determinantes na arquitetura da panícula, afetando o número de ramificações e o número de grãos por panícula (Zhang et al., 2021). Aqui foi observado que a suplementação das plantas de arroz com citocinina aumentou a ramificação das panículas, o número de grãos por panícula, o número de grãos por planta e a biomassa de grãos (Figura 1). Estes três últimos componentes são os principais parâmetros que compõe o rendimento de plantas de arroz (Peleg et al., 2011; Li et al., 2013). Isso pode estar relacionado a uma redução na expressão de oxidases de citocininas (CKX) na panícula em função do tratamento das plantas com citocinina, promovendo, assim, um acúmulo de citocininas no meristema da inflorescência e aumentando o número de órgãos reprodutivos (Koprna et al., 2016; Guo et al., 2020; Zhang et al., 2021).

As citocininas estimulam o desenvolvimento da parte aérea, mas inibem o desenvolvimento da raiz (Li et al., 2013; Rivas et al., 2022), reduzindo a razão raiz parte aérea (Figura 2). O tratamento das plantas de arroz com citocinina melhorou o perfilhamento das plantas, embora esse efeito não tenha sido convertido em maior número de panículas nas plantas (Figuras 2 e S1). No entanto, a citocinina reduziu a área foliar específica das plantas de arroz, independentemente da fertilização com Se (Figura 2). A redução na área foliar específica está relacionada ao aumento nas taxas fotossintéticas (Meziane and Shipley, 2001), o que foi verificado neste estudo (Figura 3). Além disso, as citocininas favorecem a alocação do carbono assimilado na parte aérea, em detrimento do sistema radicular, aumentando a produção de grãos (Beck, 1996). Neste sentido, os ganhos quantitativos no rendimento de grãos das plantas de arroz tratadas com citocinina podem ser atribuídos ao incremento na taxa de assimilação líquida de CO₂ e na taxa de transpiração no início do enchimento de grãos (Figura 3).

A fotossíntese foliar fornece carboidratos para o desenvolvimento da panícula e para o enchimento de grãos, que é uma etapa crucial para a produção das plantas (Zhang et al., 2021; Chen et al., 2022). Neste contexto, as citocininas alteram a coordenação entre a capacidade da fonte em fornecer fotoassimilados à medida que mantem a exportação para os órgãos dreno em crescimento (Javid et al., 2011; Peleg et al., 2011). O enchimento de grãos em arroz é assíncrono, tendo início nos grãos da posição superior da panícula e posteriormente nos grãos da posição inferior, que apresentam enchimento mais lento e incompleto (Chen et al., 2022). Assim, as citocininas podem aumentar a síntese de açúcares solúveis e amido nos grãos da posição inferior da panícula de arroz melhorando o enchimento desses grãos, o que contribui para o aumento da biomassa final de grãos (Chen et al., 2023). A concentração de açúcares solúveis e amido em grãos inferiores de panículas de arroz aos 6 dias após a antese aumentou nas plantas tratadas com citocinina de forma independente do Se (Figura 3). Esse resultado sugere que o Se não alterou a regulação do metabolismo de carboidratos em resposta à disponibilidade de citocinina. O acúmulo de amido nos grãos da posição inferior da panícula na fase inicial de enchimento nas plantas tratadas com citocininas, pode estar relacionado ao aumento da atividade dos drenos em função do aumento da atividade da SuSy, AGP e StS, enzimas relacionadas a degradação/síntese de sacarose e biossíntese de amido (Chen et al., 2022). Os resultados do presente trabalho mostram que a concentração de amido nos grãos foi reduzida ao final do ciclo nas plantas tratadas com citocinina (Figura 4), indicando que o efeito benéfico das citocininas no acúmulo de amido nos grãos é mais pronunciado no início do enchimento de grãos. Entretanto, essa redução no acúmulo de amido nos grãos maduros não prejudicou a biomassa final de grãos de arroz (Figura 1 e 4), que foi positivamente regulada por citocinina.

O arroz é um alimento básico na alimentação sendo fonte de proteínas e aminoácidos essenciais para a população humana (Amagliani et al., 2017). Estudos anteriores forneceram informações de que o Se aumenta as concentrações de proteína e aminoácidos nos grãos de arroz em resposta a fertilização com nitrogênio (Teixeira et al., 2021). Os resultados desse estudo mostram que os grãos das plantas de arroz tratadas com Se ou citocinina, isoladamente, apresentaram um aumento na concentração de aminoácidos. Entretanto, quando o Se e a citocinina foram aplicados em conjunto, a concentração de aminoácidos nos grãos foi ainda maior quando comparado aos grãos das plantas que receberam os tratamentos isolados (Figura 4), sugerindo um efeito aditivo do Se e da citocinina no acúmulo de aminoácidos nos grãos de arroz. Entretanto, o Se não alterou significativamente as concentrações das proteínas de reserva e, conseqüentemente não houve alteração nas concentrações de proteínas totais, sugerindo que

o Se não afeta a biossíntese de proteínas nos grãos de arroz possivelmente por ser um processo compartimentalizado. Interessantemente, as citocininas por si só reduziram a concentração de prolamina, mas aumentaram significativamente a concentração de glutelina nos grãos (Figura 4). A fração de glutelina corresponde a 60-80% da proteína total de armazenamento dos grãos (Kawakatsu et al. 2010), assim, a citocinina também aumentou as concentrações de proteínas totais nos grãos de arroz. O valor nutricional da glutelina é superior, pois apresenta maior conteúdo do aminoácido lisina em sua composição e apresenta maior digestibilidade em humanos (Ogawa et al, 1987). Neste sentido, a pulverização das plantas com citocininas foi capaz de alterar a proporção das proteínas de reserva, aumentando a concentração de proteínas com maior valor nutricional no grão de arroz.

Os grãos de arroz são fonte de importantes minerais essenciais para a saúde humana (Saleh et al., 2019; Zhang et al., 2021). O presente estudo indicou que o Se por si só tende a aumentar as concentrações de N, S, Ca, P, Fe, Mn B e Cu, e a diminuir as concentrações de Mg, K e Zn nos grãos de arroz (Figura 6). Esses resultados reforçam a flexibilidade que o Se tem em modificar a concentração de importantes minerais em grãos de arroz (Teixeira et al., 2021). Entretanto, a redução observada na absorção e acúmulo de Fe, Mn, B, Cu e Zn nas raízes e nos grãos de arroz induzida pela citocinina não foi revertida ou mesmo mitigada pela fertilização com Se (Figuras 5 e 6). A quantidade de minerais nos grãos é o resultado do equilíbrio entre a absorção pela raiz, distribuição e alocação nos grãos (Yoneyama et al., 2016). As citocininas regulam negativamente o desenvolvimento das raízes (Rivas et al., 2022), o que presumivelmente poderia reduzir a absorção de nutrientes. Os resultados revelaram que a aplicação de citocinina nas plantas de arroz reduziu drasticamente a biomassa de raízes e a razão raiz parte aérea, e que a redução nesses parâmetros não foi revertida pelo Se (Figura 2). Neste contexto, a redução quantitativa nas concentrações de micronutrientes pode ser explicada pela redução na biomassa de raízes provocada pela citocinina, mesmo nas plantas tratadas com Se. Além disso, esse efeito pode ser reforçado por uma possível redução na expressão de genes relacionados ao transporte de íons tanto nas raízes quanto em folhas bandeira, visto que as citocininas regulam negativamente a expressão de diversos transportadores de minerais (Gao et al., 2019). Entretanto, a absorção pelas raízes e o acúmulo de Se nos grãos de arroz não foram afetados pela citocinina. Curiosamente, a citocinina tendeu a elevar a concentração de Se nas raízes e nos grãos das plantas fertilizadas com Se (Figuras 5 e 6). É bem documentado que o acúmulo de Se nas raízes e nos grãos de arroz é controlado por *OsSULTR1.2*, *OsPT2* e *NRT1.1B*, transportadores relacionados a absorção de S, P e N (Gupta e Gupta, 2017; Liang et al., 2019; Teixeira et al., 2021). Em conjunto, esses resultados sugerem que o efeito repressor

das citocininas nos transportadores de nutrientes seja mais pronunciado para os transportadores de micronutrientes, não afetando, portanto, as vias de absorção e acúmulo de Se nos grãos de arroz. Além disso, as concentrações de N, Mg, S, Ca e P nos grãos foram semelhantes nas plantas tratadas e não tratadas com citocinina, enquanto a concentração de K nos grãos das plantas tratadas com Se foi elevada pela aplicação de citocinina (Figura 6). As concentrações de N, Mg, S e Ca nas raízes também se mantiveram constantes nas plantas tratadas e não tratadas com citocinina, enquanto os níveis de P e K nas raízes foram aumentados nas plantas tratadas com citocinina em relação as raízes das plantas não tratadas (Figura 5). Em conjunto, esses resultados relevam um possível efeito diferencial das citocininas sobre a regulação dos transportadores de macro e micronutrientes em plantas de arroz.

5 CONCLUSÃO

A citocinina melhora as características agronômicas e os principais componentes de rendimento de grãos de arroz, independentemente da fertilização das plantas com Se. Além disso, a citocinina aumenta a taxa de fotossíntese líquida das plantas de arroz no início do enchimento dos grãos, melhorando a capacidade das folhas em produzir fotoassimilados para manter o enchimento dos grãos em desenvolvimento. Observa-se ainda que a citocinina modifica a composição das proteínas de reserva, aumentando as concentrações de proteínas totais nos grãos independentemente da fertilização com Se. No entanto, o Se quando aplicado juntamente com a citocinina incrementa as concentrações de aminoácidos nos grãos de arroz, em relação aos grãos das plantas tratadas isoladamente com citocinina ou Se. A citocinina inibe a absorção e acúmulo de micronutrientes nas raízes e nos grãos, e esse efeito não foi mitigado pela fertilização com Se. Isso pode estar associado a redução da biomassa de raízes mediada pela citocinina, mesmo nas plantas tratadas com Se. Entretanto, a absorção e o acúmulo de Se nas raízes e nos grãos de arroz não são afetados pela citocinina.

REFERÊNCIAS

- Amagliani, L.; O'Regan, J.; Kelly, A.L.; O'Mahony, J.A. Composition and protein profile analysis of rice protein ingredients. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 59, p. 18-26, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.12.026>.
- Beck, E. H. Regulation of shoot/root ratio by cytokinins from roots in *Urtica dioica*: Opinion. *Plant and Soil*, v. 185, p. 1–12, 1996. <https://doi.org/10.1007/BF02257560>.
- Boldrin, P. F.; Faquin, V.; Ramos, S. J.; Boldrin, K. V. F.; Ávila, F. W.; Guilherme, L. R. G. Soil and foliar application of selenium in rice biofortification. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 31, p. 238-244, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.06.002>
- Chen, Y.; Fang, W.; Chen, S.; Zhang, Y.; Ansah, E. O.; An, G.; Xiong, F.; Wu, Y. Effects of endogenous cytokinin on physicochemical properties of superior and inferior grain starch in rice. *Die Starke*, v. 75, p. 1–12, 2023. <https://doi.org/10.1002/star.202200151>
- Chen, Y.; Teng, Z.; Yuan, Y.; Yi, Z.; Zheng, Q.; Yu, H.; Lv, J.; Wang, Y.; Duan, M.; Zhang, J.; Ye, N. Excessive nitrogen in field-grown rice suppresses grain filling of inferior spikelets by reducing the accumulation of cytokinin and auxin. *Field crops research*, v. 283, e108542, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2022.108542>
- Cross, J. M.; von Korff, M.; Altmann, T.; Bartzetko, L.; Sulpice, R.; Gibon, Y.; Palacios, N.; Stitt, M. Variation of enzyme activities and metabolite levels in 24 Arabidopsis accessions growing in carbon-limited conditions. *Plant Physiology*, v. 142, p. 1574–1588, 2006. <https://doi.org/10.1104/pp.106.086629>.
- Das, D.; Seal, P.; Biswas, A. K. Influence of selenium on growth, antioxidants production and physiological parameters of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings and its possible reversal by coapplication of sulphate. *American journal of plant sciences*, v. 10, n. 12, p. 2236–2278, 2019. <https://doi.org/10.4236/ajps.2019.1012158>
- El Mehdawi, A. F.; Jiang, Y.; Guignardi, Z. S.; Esmat, A.; Pilon, M.; Pilon-Smits, E. A. H.; Schiavon, M. Influence of sulfate supply on selenium uptake dynamics and expression of sulfate/selenate transporters in selenium hyperaccumulator and non-hyperaccumulator Brassicaceae. *New Phytologist*, v. 217, p. 194–205, 2018. <https://doi.org/10.1111/nph.14838>.
- Gao, S.; Xiao, Y.; Xu, F.; Gao, X.; Cao, S.; Zhang, F.; Wang, G.; Sanders, D.; Chu, C. Cytokinin-dependent regulatory module underlies the maintenance of zinc nutrition in rice. *New Phytologist*, v. 224, p. 202-215, 2019. <https://doi.org/10.1111/nph.15962>.
- Gu, B.; Zhou, T.; Luo, J.; Liu, H.; Wang, Y.; Shangguan, Y.; Zhu, J.; Li, Y.; Sang, T.; Wang, Z.; Han, B. An-2 encodes a cytokinin synthesis enzyme that regulates awn length and grain production in rice. *Molecular Plant*, v. 8, p. 1635–1650, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.08.001>
- Guo, T., Lu, Z. Q., Shan, J. X., Ye, W. W., Dong, N. Q., & Lin, H. X. ERECTA1 acts upstream of the OsMKK10-OsMKK4-OsMPK6 cascade to control spikelet number by regulating

- cytokinin metabolism in rice. *Plant Cell*, v. 32, n. 9, pp. 2763-2779, 2020. <https://doi.org/10.1105/tpc.20.00351>
- Gupta, M.; Gupta, S. An overview of selenium uptake, metabolism, and toxicity in plants. *Frontiers in Plant Science*, v. 7, e2074, 2017. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016>.
- Hosseini, M. S.; Mearaji, H. S.; Tavakoli, A.; Fotovat, R. The influence of foliar application of cytokinin on wheat cultivars' physiological traits and yield. *Journal of Crop Science Research in Arid Regions*, v. 4, p. 1-17, 2022. <https://doi.org/10.22034/CSRAR.2022.306638.1138>
- Islam, M. R.; Islam, M. S.; Akter, N.; Mohi-Ud-Din, M.; Mostofa, M. G. Foliar application of cytokinin modulates gas exchange features, water relation and biochemical responses to improve growth performance of maize under drought stress. *Phyton*, v. 91, p. 633-649, 2022. <https://doi.org/10.32604/phyton.2022.018074>
- Jameson, P. E.; Song, J. Cytokinin: a key driver of seed yield. *Journal of Experimental Botany*, v. 67, n. 3, p. 593–606, 2016. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv461>
- Javid, M. G.; Sorooshzadeh, A.; Sanavy, S. A. M. M.; Allahdadi, I.; Moradi, F. Effects of the exogenous application of auxin and cytokinin on carbohydrate accumulation in grains of rice under salt stress. *Plant Growth Regulation*, v. 65, p. 305–313, 2011. <https://doi.org/10.1007/s10725-011-9602-1>
- Jiang, L.; Liu, C.; Cao, H.; Chen, Z.; Yang, J.; Cao, S.; Wei, Z. The role of cytokinin in selenium stress response in *Arabidopsis*. *Plant Science: an international journal of experimental plant biology*, v. 281, p. 122–132, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.01.028>
- Kawakatsu, T.; Takaiwa, F. Síntese de proteínas para armazenamento de sementes de cereais: processos fundamentais para a produção de proteínas recombinantes em grãos de cereais. *Journal of Plant Biotechnology*, v. 8, p. 939–953, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2010.00559.x>
- Koprna, R.; De Diego, N.; Dundálková, L.; Spíchal, L. Use of cytokinins as agrochemicals. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 24, p. 484–492, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.12.022>
- Li, S.; Zhao, B.; Yuan, D.; Duan, M.; Qian, Q.; Tang, L.; Wang, B.; Liu, X.; Zhang, J.; Wang, J.; Sun, J.; Liu, Z.; Feng, Y. Q.; Yuan, L.; Li, C. Rice zinc finger protein DST enhances grain production through controlling *Gn1a/OsCKX2* expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 110, p. 3167-3172, 2013. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300359110>.
- Liang, Y.; Su, Y.; Li, L.; Huang, X.; Panhwar, F. H.; Zheng, T.; Tang, Z.; Ei, H. H.; Farooq, M. U.; Zeng, R.; Zhang, Y.; Ye, X.; Jia, X.; Zheng, L.; Zhu, J. Quick selenium accumulation in the selenium-rich rice and its physiological responses in changing selenium environments. *BMC Plant Biology*, v. 19, p. 559, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2163-6>.
- Lichtenthaler, H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes. *Methods in Enzymology*, v. 148, p. 350-382, 1987. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1)

- Malheiros, R. S. P.; Gonçalves, F. C. M.; Brito, F. A. L.; Zsögön, A.; Ribeiro, D. M. Selenomethionine induces oxidative stress and modifies growth in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings through effects on hormone biosynthesis and primary metabolism. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 189, e109942, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109942>
- Meziane, D.; Shipley, B. Direct and indirect relationships between specific leaf area, leaf nitrogen and leaf gas exchange. Effects of irradiance and nutrient supply. *Annals of Botany*, v. 88, p. 915-927, 2001. <https://doi.org/10.1006/anbo.2001.1536>.
- Muñoz-Huerta, R. F.; Guevara-Gonzalez, R. G.; Contreras-Medina, L. M.; Torres-Pacheco, I.; Prado-Olivarez, J.; Ocampo-Velazquez, R. V. A review of methods for sensing the nitrogen status in plants: advantages, disadvantages and recent advances. *Sensors*, v. 13, p. 10823–10843, 2013. <https://doi.org/10.3390/s130810823>.
- Ogawa, M.; Kumamaru, T.; Satoh, H.; Iwata, N.; Omura, T.; Kasai, Z.; Tanaka, K. Purification of protein body-I of rice seed and its polypeptide composition. *Plant & Cell Physiology*, v. 28, p. 1517-1527, 1987.
- Panda, B. B.; Sekhar, S. S.; Dash, S. K.; Behera, L.; Shaw, B. P. Biochemical and molecular characterisation of exogenous cytokinin application on grain filling in rice. *BMC Plant Biology*, v. 18, n. 1, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1279-4>
- Pavlů, J.; Novák, J.; Koukalová, V.; Luklová, M.; Brzobohatý, B.; Černý, M. Cytokinin at the Crossroads of abiotic stress signalling pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, p. 2450, 2018. <https://doi.org/10.3390/ijms19082450>
- Peleg, Z.; Reguera, M.; Tumimbang, E.; Walia, H.; Blumwald, E. Cytokinin-mediated source/sink modifications improve drought tolerance and increase grain yield in rice under water-stress. *Plant biotechnology journal*, v. 9, p. 747–758, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2010.00584.x>
- Reis, H. P. G.; Barcelos, J. P. Q.; Silva, V. M.; Santos, E. F.; Tavanti, R. F. R.; Putti, F. F.; Young, S. D.; Broadley, M. R.; White, P. J.; dos Reis, A. R. Agronomic biofortification with selenium impacts storage proteins in grains of upland rice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 100, p. 1990–1997, 2020. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10212>.
- Rivas, M. Á.; Friero, I.; Alarcón, M. V.; Salguero, J. Auxin-cytokinin balance shapes maize root architecture by controlling primary root elongation and lateral root development. *Frontiers in Plant Science*, v. 13, e836592, 2022. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.836592>.
- Saleh, A.S.M.; Wang, P.; Wang, N.; Yang, L.; Xiao, Z. Brown rice verSuSy white rice: nutritional quality, potential health benefits, development of food products, and preservation technologies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 18, p. 1070–1096, 2019. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12449>.
- Shah, S.; Cai, L.; Li, X.; Fahad, S.; Wang, D. Influence of cultivation practices on the metabolism of cytokinin and its correlation in rice production. *Food and energy security*, v. 12, p. 1-13, 2023. <https://doi.org/10.1002/fes3.488>

- Tao, Y.; Miao, J.; Wang, J.; Li, W.; Xu, Y.; Wang, F.; Jiang, Y.; Chen, Z.; Fan, F.; Xu, M.; Zhou, Y.; Liang, G.; Yang, J. RGG1, involved in the cytokinin regulatory pathway, controls grain size in rice. *Rice*, v. 13, 2020. <https://doi.org/10.1186/s12284-020-00436-x>
- Teixeira, L. S.; Pimenta, T. M.; Brito, F. A. L.; Malheiros, R. S. P.; Arruda, R. S.; Araújo, W. L.; Ribeiro, D. M. Selenium uptake and grain nutritional quality are affected by nitrogen fertilization in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Reports*, v. 40, p. 871–880, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00299-021-02685-6>.
- Wang, C.; Wang, G.; Gao, Y.; Lu, G.; Habben, J. E.; Mao, G.; Chen, G.; Wang, J.; Yang, F.; Zhao, X.; Zhang, J.; Mo, H.; Qu, P.; Liu, J.; Greene, T.W. A cytokinin-activation enzyme-like gene improves grain yield under various field conditions in rice. *Plant molecular biology*, v. 102, p. 373–388, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11103-019-00952-5>
- Wheal, M.S.; Fowles, T.O.; Palmer, L.T. A cost-effective acid digestion method using closed polypropylene tubes for inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) analysis of plant essential elements. *Analytical Methods*, v. 3, p. 2854-2863, 2011. <https://doi.org/10.1039/c1ay05239>
- Yoneyama, T.; Tanno, F.; Tatsumi, J.; Mae, T. Whole-plant dynamic system of nitrogen use for vegetative growth and grain filling in rice plants (*Oryza sativa* L.) as revealed through the production of 350 grains from a germinated seed over 150 days: a review and synthesis. *Frontiers in Plant Science*, v. 7, p. 1151, 2016. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01151>
- Zhang, H.; Chen, T.; Wang, Z.; Yang, J.; Zhang, J. Involvement of cytokinins in the grain filling of rice under alternate wetting and drying irrigation. *Journal of experimental botany*, v. 61, p. 3719–3733, 2010. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq198>
- Zhang, L.; Hu, B.; Deng, K.; Gao, X.; Sun, G.; Zhang, Z.; Li, P.; Wang, W.; Li, H.; Zhang, Z.; Fu, Z.; Yang, J.; Gao, S.; Li, L.; Yu, F.; Li, Y.; Ling, H.; Chu, C. NRT1.1B improves selenium concentrations in rice grains by facilitating Selenomethionine translocation. *Plant Biotechnology Journal*, v. 17, p. 1058-1068, 2019. <https://doi.org/10.1111/pbi.13050>
- Zhang, L.H.; Hu, B.; Li, W.; Che, R.H.; Deng, K.; Li, H.; Yu, F.Y.; Ling, H.; Li, Y.; Chu, C. OsPT2, a phosphate transporter, is involved in the active uptake of selenite in rice. *New Phytol.* v. 201, p. 1183-1191, 2014. <https://doi.org/10.1111/nph.12592>
- Zhang, W.; Peng, K.; Cui, F.; Wang, D.; Zhao, J.; Zhang, Y.; Yu, N.; Wang, Y.; Zeng, D.; Wang, Y.; Cheng, Z.; Zhang, K. Cytokinin oxidase/dehydrogenase *OsCKX11* coordinates source and sink relationship in rice by simultaneous regulation of leaf senescence and grain number. *Plant biotechnology journal*, v. 19, p. 335–350, 2021. <https://doi.org/10.1111/pbi.13467>
- Zhao, X.Q.; Mitani, N.; Yamaji, N.; Shen, R.F.; Ma, J.F. Involvement of silicon influx transporter OsNIP2;1 in selenite uptake in rice. *Plant Physiology*, v. 153, p. 1871-1877, 2010. <https://doi.org/10.1104/pp.110>

MATERIAL SUPLEMENTAR

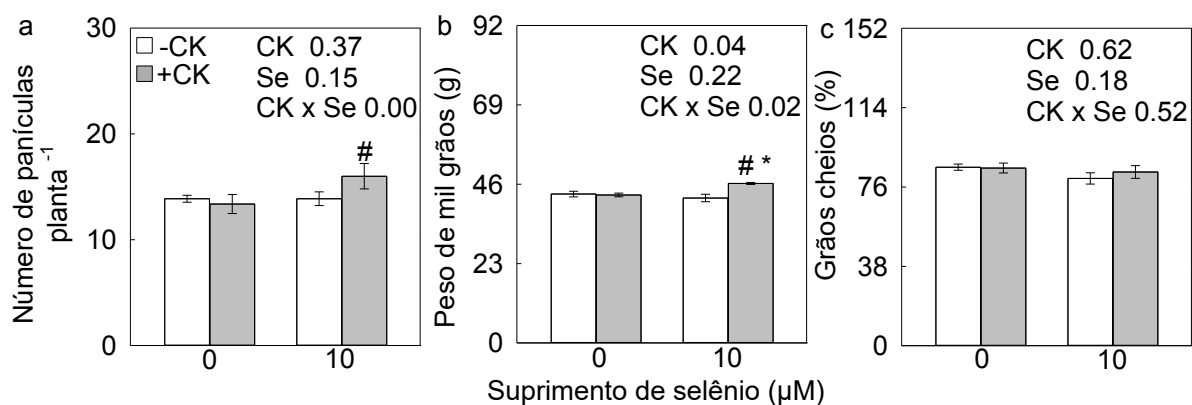


Figura S1. Efeito dos tratamentos com Se e citocininas, isolados ou em combinação, nos parâmetros produtivos do arroz. **a.** Número de panículas por planta **b.** Peso de mil grãos **c.** Porcentagem de grãos cheios. Asteriscos representam diferença estatística entre os tratamentos com citocinina dentro da mesma condição de Se. Hashtags representam diferença estatística entre os tratamentos com Se dentro da mesma condição de citocinina. Teste Tukey ($P < 0,05$). Médias de quatro repetições \pm erro da média.

Tabela S1. Propriedades químicas do solo utilizado nos experimentos.

Propriedades	Solo
pH	5.1
Zn (mg dm ⁻³)	5.2
P (mg dm ⁻³)	166.2
K (mg dm ⁻³)	730
Ca (cmol _c dm ⁻³)	9.6
Mg (cmol _c dm ⁻³)	5.2
Al (cmol _c dm ⁻³)	0.1
H+Al (cmol _c dm ⁻³)	4.6
CEC (cmol _c dm ⁻³)	21.3
m (%)	0.6
V (%)	78.4

P, fósforo; K, potássio; Ca, cálcio; Mg, magnésio; Al, alumínio trocável; H+Al, acidez trocável; CTC, capacidade de troca de cátions; m, saturação por alumínio; e V, saturação por bases.

CONCLUSÃO GERAL

Este estudo mostrou que as plantas de arroz adaptam seu crescimento e desenvolvimento em resposta a mudanças nos níveis de selênio, zinco e nitrogênio no meio de cultivo das plantas. Grande parte dessas respostas está ligada a modificações no metabolismo de citocininas das plantas de arroz. Os níveis de citocinina nas plantas de arroz aumentam em resposta a disponibilidade de zinco, reduzindo a biomassa do sistema radicular das plantas de arroz. O selênio recupera parcialmente a produção de biomassa de raízes nas plantas fertilizadas com zinco via redução nos níveis de citocininas na raiz. O selênio melhora o rendimento de grãos das plantas tratadas com zinco em função do acúmulo de citocininas nas panículas. A suplementação das plantas com selênio melhora a concentração de proteínas nos grãos em resposta a disponibilidade de zinco, ao passo que as concentrações de N, S, Mg, Ca, Fe e Cu nos grãos aumentam independente do fornecimento de zinco. Observa-se ainda que a suplementação das plantas com zinco aumenta a expressão de *NRT1.1B* favorecendo o acúmulo de selênio nos grãos de arroz.

O fornecimento de selênio às mudas de arroz tratadas com 0,05 mM de nitrato altera o equilíbrio de açúcares e citocininas, provocando alterações fenotípicas no sistema radicular e na parte aérea das plântulas de arroz. Neste sentido, o selênio regula o metabolismo do açúcar e a biossíntese de citocininas para lidar com a restrição de nitrato. Por outro lado, em condições de alta concentração de nitrato (5,0 mM), o selênio inibe a biossíntese de citocininas e aumenta o tamanho do sistema radicular das plântulas de arroz regulando positivamente a expressão de genes relacionados a expansão celular. Ao mesmo tempo o selênio reduz a translocação de citocinina da raiz para a parte aérea, reduzindo o crescimento da parte aérea das plântulas de arroz.

A aplicação de citocinina nas plantas de arroz melhora as características agrônômicas e os principais componentes de rendimento de grãos de arroz, independentemente da fertilização das plantas com selênio. A citocinina estimula a fotossíntese líquida das plantas de arroz, melhorando a capacidade de produzir fotoassimilados para manter o enchimento dos grãos em desenvolvimento. A citocinina reduz a biomassa das raízes das plantas de arroz, e esse efeito não é revertido pelo selênio. Em conjunto esses resultados sugerem que a redução da biomassa de raízes, mediada pela citocinina, impacta negativamente a capacidade de absorção e acúmulo de micronutrientes nas raízes e nos grãos de arroz, mesmo nas plantas tratadas com selênio. No entanto, a absorção e o acúmulo de selênio nos grãos de arroz são mantidos. Além disso, a

citocinina modifica a proporção das proteínas de reserva, aumentando as concentrações de proteínas totais nos grãos independentemente da fertilização com selênio.

Em resumo, os resultados do presente trabalho sugerem uma interação complexa entre o selênio, zinco e nitrato na regulação do metabolismo das citocininas em plantas de arroz.