

PEDRO HENRIQUE SANTOS NEVES

**EFEITO DO SILÍCIO NOS MECANISMOS DE TOLERÂNCIA AO ESTRESSE
POR ARSÊNIO EM *Pistia stratiotes* L.**

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

Orientador: Juraci Alves de Oliveira

Coorientador: Fábio Murilo DaMatta

VIÇOSA – MINAS GERAIS

2020

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

T

N518e
2020

Neves, Pedro Henrique Santos, 1994-

Efeito do silício nos mecanismos de tolerância ao estresse
por arsênio em *Pistia stratiotes* / Pedro Henrique Santos Neves.

– Viçosa, MG, 2020.

38 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Juraci Alves de Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 33-38.

1. Plantas aquáticas. 2. Ácido silícico. 3. Arsenitos. 4. Stress oxidativo. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22 ed. 581.76

PEDRO HENRIQUE SANTOS NEVES

**EFEITO DO SILÍCIO NOS MECANISMOS DE TOLERÂNCIA AO ESTRESSE
POR ARSÊNIO EM *Pistia stratiotes* L.**

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

APROVADA: 21 de fevereiro de 2020.

Assentimento



Pedro Henrique Santos Neves
Autor



Juraci Alves de Oliveira
Orientador

A Valdir Alves da Neves e Palmira Pereira das Neves, pelo amor, carinho e sacrifício em prol do meu sucesso, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que nunca me desamparou e, com a fé que deposito nele, concluo esta etapa na minha vida.

Aos meus familiares: tios (as), primos (as), irmãs, em especial minha avó Palmira, meu avô Valdir, minha mãe Cátia e minha tia Rose, que por muitas vezes abriram mão dos seus sonhos e desejos para que eu pudesse realizar o meu, por isso essa conquista é mais de vocês do que minha.

À minha esposa Patrícia, que me acompanhou nessa árdua batalha, esteve ao meu lado nos momentos mais difíceis sempre me apoiando e me lembrando todos os dias do meu potencial. Sem dúvidas, eu não teria conseguido sem você.

Aos colegas do laboratório de Biofísica Ambiental (Cláudio, Daniel, Dielle, Fernando, Heloísa, Letícia, Thaline e Vinícius), que entraram nessa empreitada comigo e não pouparam esforços para me ajudar.

Ao meu orientador, Professor Juraci Alves de Oliveira, que, desde a minha chegada em Viçosa, fez de tudo para que eu me sentisse em casa.

Ao meu coorientador, Professor Fábio Murilo DaMatta que, além de orientar, sempre me deu bons conselhos.

À UFV pela estrutura e funcionários, sem os quais esse trabalho não poderia ter sido desenvolvido.

Aos meus amigos “Os PAIAS” que, mesmo de longe, sempre torceram por minhas vitórias e constituem parte fundamental para o meu sucesso.

Agradeço aos meus amigos do grupo NFL do Caos, por me darem forças sempre que pensei em desistir.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Geras (FAPEMIG) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A todos, meus sinceros agradecimentos !!!

RESUMO

SANTOS-NEVES, Pedro Henrique, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2020. **Efeito do silício nos mecanismos de tolerância ao estresse por arsênio em *Pistia stratiotes* L.** Orientador: Juraci Alves de Oliveira. Coorientador: Fábio Murilo DaMatta

Embora seja uma operação de grande importância para a fabricação de bens de consumo indispensáveis para o homem, a mineração pode causar sérios impactos ambientais pela geração de resíduos, os quais contêm metais pesados e metaloides, incluindo o arsênio (As). Estudos demonstram a possibilidade da utilização da macrófita aquática *Pistia stratiotes* na remediação de ambientes contaminados com metais pesados. Com a finalidade de potencializar os mecanismos de tolerância dessa espécie ao As, o presente estudo teve como objetivo avaliar o papel do silício (Si) como agente estimulante dos mecanismos de defesa das plantas em resposta à presença desse poluente em meio aquático. Para tal, plantas de *P. stratiotes*, foram aclimatadas por 5 dias em solução nutritiva de Clark ½ força iônica, pH 6,5, em salas de crescimento com temperatura e intensidade luminosa controlados, antes de serem submetidas aos tratamentos com arsenito (arsenito de sódio 10 µM); Si (ácido monossilícico 2 mM) e combinação de As e Si, nas mesmas concentrações anteriores, por 3 d. Plantas expostas ao As apresentaram perda de raízes, redução da taxa de crescimento relativo (TCR), maiores concentrações de espécies reativas de oxigênio (ROS), maior atividade do sistema antioxidante enzimático e redução nos teores dos compostos do sistema antioxidante não enzimático, além de maiores danos oxidativos em membranas e no aparato fotossintético, confirmando o potencial tóxico desse metaloide. A adição de Si, no entanto, mitigou parcialmente a maioria dos danos causados pelo As às plantas, com maior TCR, redução na concentração de ROS e na atividade/níveis dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, além de reduzir as perdas fotossintéticas e na fluorescência da clorofila a. Conclui-se, portanto, que o Si exerce papel importante no aumento da tolerância de *P. stratiotes* ao As por meio de estímulos dos seus sistemas antioxidantes e imobilização do metaloide, fazendo com que as plantas acumulem maiores concentrações do poluente sem que, com isso, apresente os efeitos tóxicos sobre o seu metabolismo.

Palavras-chave: Ácido monossilícico. Arsenito. Estresse oxidativo. Planta aquática.

ABSTRACT

SANTOS-NEVES, Pedro Henrique, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2020. **Effect of silicon on arsenic stress tolerance mechanisms in *P. stratiotes* L.** Adviser: Juraci Alves de Oliveira. Co-adviser: Fábio Murilo DaMatta

Although it is an operation of great importance for the manufacture of consumer goods indispensable to man, mining can cause serious environmental impacts by generating waste, which contains heavy metals and metalloids, including arsenic (As). Studies demonstrate the possibility of using the aquatic macrophyte *Pistia stratiotes* in the remediation of environments contaminated with heavy metals. In order to enhance the tolerance mechanisms of this species to As, the present study aimed to evaluate the role of silicon (Si) as a stimulating agent in the defense mechanisms of plants in response to the presence of this pollutant in an aquatic environment. To this end, plants of *P. stratiotes* were acclimated for 5 days in a Clark nutrient solution, ½ ionic strength, pH 6.5, in growth rooms with controlled temperature and light intensity, before being subjected to treatments with arsenite (arsenite from sodium 10 µM); Si (2 mM monosilicic acid) and combination of As and Si, in the same concentrations above, for 3 d. Plants exposed to As showed loss of roots, reduced relative growth rate (TCR), higher concentrations of reactive oxygen species (ROS), greater activity of the enzymatic antioxidant system and reduction in the contents of the compounds of the non-enzymatic antioxidant system, in addition to greater oxidative damage in membranes and in the photosynthetic apparatus, confirming the toxic potential of this metalloid. The addition of Si, however, partially mitigated most of the damage caused by As to plants, with higher TCR, reduced ROS concentration and activity/levels of enzymatic and non-enzymatic antioxidants, in addition to reducing photosynthetic losses and fluorescence chlorophyll a. It is concluded, therefore, that Si plays an important role in increasing the tolerance of *P. stratiotes* to As by stimulating its antioxidant systems and immobilizing the metalloid, causing plants to accumulate higher concentrations of the pollutant without, with that, show toxic effects on your metabolism.

Keywords: Monosilicic acid. Arsenite. Oxidative stress. Aquatic plant.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	8
MATERIAL E MÉTODOS	11
RESULTADOS	18
DISCUSSÃO	26
CONCLUSÕES	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

INTRODUÇÃO

A mineração é uma das atividades industriais mais importantes do país, tendo contribuído com 30% do saldo comercial em 2017, com destaque para as exportações de minério de ferro, ouro e cobre, dentre outros minerais. As principais regiões dessa atividade encontram-se em Minas Gerais, que contribuiu, em 2017, com 54,3% do saldo das atividades mineradoras de todo o país (IBRAM, 2018). Essas atividades, no entanto, podem resultar em impactos ambientais de grandes proporções, desde o processo de implantação da mina até a deposição final dos rejeitos, envolvendo supressão de vegetação nativa, lixiviação de resíduos tóxicos e barragens para a contenção de resíduos. Fatos recentes externaram esse potencial de impacto, com o rompimento das barragens de Fundão e de Brumadinho, ambas em Minas Gerais.

Dentre os resíduos tóxicos gerados, a liberação de compostos de arsênio (As) para o meio aquático, resultante da mineração de ouro, tem se constituído motivo de enorme preocupação, não somente pelo elevado risco toxicológico mas, também, pela facilidade em atingir os diversos níveis tróficos, num processo de biomagnificação. O As encontra-se naturalmente associado aos solos e rochas, na forma de arsenopiritas, o qual, por ações antrópicas, é liberado no ambiente e facilmente disperso no sistema aquático (Kumar et al., 2015), onde predomina, basicamente, em duas formas químicas inorgânicas: arsenato (As^{V}) e arsenito (As^{III}). Essas formas químicas são interconversíveis, dependentes do estado redox do ambiente aquático onde se encontram (Ozturk et al., 2010). O As^{III} é considerado mais tóxico, exercendo efeitos em diversas funções biológicas, por meio da ligação a proteínas (Abbas et al., 2018 e Verma et al., 2016), geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), inibição da respiração e ação mutagênica, induzindo recombinação homóloga (Helleday et al., 2000). O As^{V} , por sua vez, além da geração de ROS, altera a organização celular e interfere na fosforilação oxidativa (Adrees et al., 2015), onde substitui o fosfato desacoplando a síntese de ATP (Abbas et al., 2018; Carbonell et al., 1998; Schneider et al., 2012; Verma et al., 2016).

Em face da elevada toxicidade, faz-se necessário a remoção do As do ambiente aquático, o que pode se dar com a utilização de diversas tecnologias, dentre as quais a fitorremediação. Nesse processo, as espécies de plantas aquáticas empregadas devem ser capazes de acumular e tolerar a presença do poluente, sem significativas alterações no seu metabolismo e sobrevivência.

A preservação dos processos metabólicos, como fotossíntese e respiração, pela ação dos mecanismos de tolerância, é indispensável para o estabelecimento das plantas em ambientes contaminados. Os mecanismos de tolerância que garantem a sobrevivência das plantas envolvem, sobretudo, a eliminação das ROS geradas em excesso, principalmente pela ação dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Singh et al., 2016). Os mecanismos enzimáticos compreendem, principalmente, a ação das enzimas SOD (dismutase do superóxido), que atua na conversão do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que, por sua vez, pode ser convertido em água pela ação da CAT (catalase), POX (peroxidases) e APX (peroxidase do ascorbato). Outros compostos como glutathione, ascorbato e compostos tiolados também fazem parte dos mecanismos antioxidantes auxiliando na remoção das ROS (Sytar et al., 2013).

Algumas substâncias atuam como agentes de estimulação às respostas de tolerância das plantas aos estresses abióticos, como o óxido nítrico (Farnese et al., 2014b) e o jasmonato (Farooq et al., 2018), dentre outras, que podem atuar em associação aos mecanismos existentes para mitigar os danos tóxicos causados pelo poluente. Nesse contexto, se insere o silício (Si), que é notadamente um agente amortizador de estresses bióticos e abióticos.

Estudos demonstraram que as plantas absorvem o Si, preferencialmente, sob a forma de ácido monossilícico (Camargo et al., 2007) e o distribuem para as folhas por meio do fluxo transpiratório (Menegale et al., 2015). O Si é associado à maior resistência ao acamamento, diminuição do ataque por pragas e doenças, devido à formação de células epidérmicas mais espessas e com maior grau de lignificação (Menegale et al., 2015), maior resistência à toxicidade associada ao alumínio (Liang et al., 2006), cádmio (Shi et al., 2010) e As (Tripathi et al., 2013). Além disso, o Si é capaz de ativar genes envolvidos na produção de compostos secundários, como polifenóis, e modular a ação de enzimas relacionadas aos mecanismos de defesas das plantas que combatem o estresse oxidativo (Gratão et al., 2005).

As formas pelas quais o Si atenua os danos causados por estresses abióticos envolvem processos de evitação e de tolerância (Wu et al., 2013). Os mecanismos de evitação visam reduzir a absorção dos elementos tóxicos e, para tanto, promovem a alteração do pH da solução, a exsudação de compostos quelantes pela raiz e a modulação da atividade de transportadores da membrana. Os processos de tolerância envolvem a restrição do transporte de íons da raiz para a parte aérea, o estímulo à síntese de quelantes

de íons (ácidos orgânicos, fitoquelatinas), a compartimentalização dos íons no vacúolo e parede celular e, por fim, a ativação do sistema antioxidante enzimático e não enzimático.

Estudos sobre a participação do Si no metabolismo de plantas aquáticas são, ainda, incipientes. A maioria dos estudos relacionam a presença desse elemento à melhor estruturação vegetal, conferindo maior rigidez às plantas e, dessa forma, maior resistência às condições ambientais de ventos, correntezas e ondas (Schoelynck e Struyf, 2016). Pesquisas também demonstram que a absorção do Si afeta diretamente o conteúdo de celulose e lignina de plantas aquáticas em órgãos que desempenham papel na estabilidade do vegetal (Schoelynck et al., 2010).

Os estudos sobre os mecanismos metabólicos de tolerância de plantas que são submetidas a estresses abióticos, assim como os fatores que o afetam, como a absorção e incorporação do Si, tornam-se importantes estratégias para melhoria dos programas de fitorremediação, podendo fornecer aporte para o entendimento e aplicação de plantas na recuperação de solos e corpos hídricos contaminados. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o papel desempenhado pelo Si nas respostas bioquímicas e fisiológicas da macrófita aquática *Pistia stratiotes* exposta a concentrações tóxicas de As, bem como a sua influência nos processos de absorção e acúmulo deste metaloide, visando identificar a participação do Si na indução dos mecanismos de tolerância das plantas expostas ao As.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do material vegetal

Espécimes de *P. stratiotes* (Araceae) foram coletados no horto botânico da Universidade Federal de Viçosa (Viçosa, MG, Brasil), desinfetadas com hipoclorito de sódio 1% durante 1 min, lavadas em água corrente, transferidas para solução nutritiva de Clark (1975), ½ força iônica, pH 6,5, e mantidas em sala de crescimento de plantas, com intensidade luminosa, temperatura e fotoperíodo controlados ($230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, 16/8 h claro/escuro), por 5 dias, para aclimação às condições experimentais.

Aplicação dos tratamentos

Após o período de aclimação, as plantas foram transferidas para recipientes contendo 0,5 L de solução nutritiva de Clark, nas mesmas condições descritas anteriormente, divididas nos seguintes tratamentos, onde permaneceram por 3 dias: 1. Controle: plantas mantidas apenas em solução nutritiva de Clark; 2. + Si: solução nutritiva + ácido monossilícico (H_4SiO_4) 2 mM; 3. + As: solução nutritiva + arsenito de sódio (NaAsO_2) 10 μM ; 4. Si + As: solução nutritiva + ácido monossilícico (2 mM) + arsenito de sódio (10 μM). O ácido monossilícico foi obtido por cromatografia de troca iônica, pela passagem da solução de silicato de potássio (K_2SiO_4) em coluna com resina trocadora de cátions (Dallagnol et al., 2011).

Determinação de As absorvido

A fim de determinar a concentração de As absorvido por *P. stratiotes*, raízes e folhas foram coletadas, lavadas em água desionizada e mantidas em estufa, a $80 \text{ }^\circ\text{C}$, até obtenção de massa seca constante. Aproximadamente 0,1 g de material seco foi mineralizado em mistura de ácido nítrico e perclórico (razão 3:1), à temperatura de $130 \text{ }^\circ\text{C}$ até a completa oxidação da matéria orgânica (Marin et al., 1993). As amostras mineralizadas foram filtradas e diluídas para 25 mL com água desionizada e, então, a concentração de As estimada com base em curva de calibração previamente preparada, por meio de espectrofotometria de absorção atômica (Modelo AA-6701F, Shimadzu Corporation) com gerador de hidreto, sendo os resultados expressos em $\mu\text{g g}^{-1} \text{MS}$.

Determinação de Si absorvido

Para determinar a concentração de Si nas plantas, 0,1 g de material seco e triturado de folhas e raízes foram acondicionados em tubos de polietileno de 15 mL, seguido de adição de 3 mL de NaOH (50%). Os tubos foram vedados, agitados em vórtex e

autoclavados a 120 °C, por 45 minutos. Em seguida, a uma alíquota de 100 µL dessa solução, adicionaram-se 6,7 mL de ácido acético (20%), 2 mL de molibdato de amônio (54 g L⁻¹, pH 7,0), 1 mL de ácido tartárico (20%) e 0,2 mL de solução redutora (mistura de solução A, composta por sulfito de sódio e ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfônico em água desionizada, e solução B composta de bissulfito de sódio em água desionizada). Após 30 min, a absorbância foi lida a 650 nm e os resultados expressos em mg g⁻¹ MS, com base numa curva-padrão de Si previamente estabelecida (Wei-min et al., 2005).

Taxa de crescimento relativo

Após o período de aclimação (5 d) e o período de tratamento (3 d), as plantas foram secas em papel absorvente e pesadas, após 3 horas do reestabelecimento da luz, em balança analítica para obtenção do peso fresco inicial e peso fresco final. A partir desses dados, calculou-se o crescimento relativo de cada planta em seus respectivos tratamentos, através da equação proposta por Hunt (1978), tendo os resultados expressos em mg dia⁻¹:

$$\text{TCR} = (\ln_{m1} - \ln_{m0} / t_1 - t_0) \times 1000$$

Em que:

TCR = taxa de crescimento relativo no período (mg g⁻¹ MF dia⁻¹);

\ln_{m1} e \ln_{m0} representam o logaritmo neperiano da massa fresca (g) no final e no início do experimento, respectivamente;

t_1 e t_0 representa a duração do experimento, em dias.

Parâmetros fotossintéticos e trocas gasosas

A avaliação das trocas gasosas foi realizada ao final do período de exposição (3 dias) ao Si e ao As, após 3 horas do reestabelecimento do período luminoso, em folha totalmente expandida. Para tanto, utilizou-se um analisador de gases a infravermelho (IRGA – Licor® modelo LI-6400/XT), com fluxo de ar de 350 mL min⁻¹ e fonte de luz acoplada de 1000 µmol m⁻² s⁻¹, e determinadas a concentração interna de carbono (C_i) (µmol m⁻² s⁻¹), a condutância estomática (g_s) (µmol de H₂O m⁻² s⁻¹), a transpiração (E) (mmol de H₂O m⁻² s⁻¹) e a taxa de fotossíntese líquida (A) (µmol de CO₂ m⁻² s⁻¹).

A fluorescência da clorofila a foi mensurada utilizando-se fluorômetro acoplado ao IRGA, na mesma folha das avaliações anteriores, pré-adaptadas ao escuro após período de 30 min, obtendo-se o rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m), taxa de transporte de elétrons (ETR), rendimento quântico efetivo do fotossistema II (ϕ PSII), dissipação fotoquímica (qP) e dissipação não fotoquímica (NPQ), sendo estimados como descrito por DaMatta e colaboradores (2002).

Pigmentos fotossintéticos

A extração da clorofila e dos carotenoides se deu a partir de três discos de 1 cm de diâmetro, obtidos da mesma folha das avaliações anteriores. Os discos foliares foram incubados em 5 mL de solução de dimetilsulfóxido (saturado por carbonato de cálcio), em tubos de ensaio devidamente tampados e revestidos com papel alumínio, incubadas por 24 horas, seguido de imersão em banho-maria a 65 °C, por 45 min. Os extratos obtidos foram lidos em espectrofotômetro e as absorbâncias determinadas nos comprimentos de onda 665, 649 e 480 nm. As leituras obtidas foram utilizadas para a estimativa dos teores de clorofila a, b e de carotenoides totais (Wellburn, 1994), sendo os resultados expressos em mg g⁻¹ MF.

$$\text{Clorofila a} = 12,47 A_{665} - 3,62A_{649}$$

$$\text{Clorofila b} = 25,06 A_{649} - 6,5A_{665}$$

$$\text{Carotenoides} = (1000A_{480} - 1.29Ca - 53.78Cb) / 220$$

Determinação da concentração de espécies reativas de oxigênio

Os níveis de H₂O₂ foram quantificados utilizando-se amostras de 200 mg de material fresco de folhas e raízes, coletadas após 3 horas do reestabelecimento do período luminoso e armazenadas em freezer -80 °C, homogeneizadas em meio de extração (tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,5, contendo hidroxilamina 1 mM), filtradas e centrifugadas a 10.000 g, por 15 minutos, a 4 °C (Kuo e Kao, 2003). Alíquotas de 100 µL do sobrenadante foram adicionadas a meio de reação contendo: solução de FeNH₄(SO₄) 250 µM, em ácido sulfúrico 62,5 mM, laranja de xilenol 1 mM e sorbitol 400 mM (Gay e Gebicki, 2000), mantidas no escuro por 30 minutos e a absorbância determinada a 560 nm. As concentrações de H₂O₂ fora estimada com base em curva de calibração, previamente preparada com padrões de H₂O₂, sendo os resultados expressos em nmol de H₂O₂ g⁻¹ MF.

Para a determinação da concentração de O₂^{•-}, amostras de 50 mg de folhas e raízes, coletadas após 3 horas do reestabelecimento do período luminoso e armazenadas em freezer -80 °C, foram incubadas em meio de extração constituído de sal dissódico do ácido etilenodiamino tetracético (Na₂EDTA) 100 µM, NADH 20 µM e tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,8 (Mohammadi e Karr 2001). A reação se iniciou com a adição de 100 µL de epinefrina 25,2 mM em HCl 0,1 N, aos tubos que foram incubadas a 28°C, sob agitação, por 5 min, seguido de leitura da absorbância a 480 nm, durante 5 minutos (Boveris et al., 2002). A concentração de O₂^{•-}, demonstrada pelo adenocromo acumulado, utilizou o

coeficiente de absorvidade molar de 4000 M^{-1} , sendo os resultados expressos em $\text{nmol de O}_2^{\cdot-} \text{ g}^{-1} \text{ MF}$ (Boveris et al., 2002).

Peroxidação lipídica

Na avaliação da peroxidação lipídica, por meio da concentração de malondialdeído (MDA), uma espécie reativa do ácido tiobarbitúrico (TBARS), amostras de 150 mg de folhas e raízes, coletadas após 3 horas do reestabelecimento do período luminoso e armazenadas em freezer $-80 \text{ }^\circ\text{C}$, foram homogeneizadas em 2 mL de ácido tricloroacético 0,1% (p/v) e centrifugadas a $10.000 \times \text{g}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$, por 20 minutos. A uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante, adicionou-se ácido tiobarbitúrico a 0,5% (p/v) em TCA 20% (p/v). A mistura foi incubada a $95 \text{ }^\circ\text{C}$, por 30 min, seguido de banho de gelo por 10 min, para interrupção da reação, e posterior centrifugação a $10000 \times \text{g}$, 4°C , por 5 min. A determinação da absorbância do extrato a 532 nm foi corrigida para absorbância não-específica a 600 nm. A concentração de MDA foi calculada utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar de 155 mM^{-1} e expressa em nmoles de MDA $\text{g}^{-1} \text{ MF}$ (Hodges et al., 1999).

Sistemas antioxidantes enzimáticos

Para determinação das atividades enzimáticas, amostras de 0,3 g de folhas e raízes, coletadas após 3 horas do reestabelecimento do período luminoso e armazenadas em freezer $-80 \text{ }^\circ\text{C}$, foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 2 mL dos seguintes meios de extração:

- Tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, EDTA 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVPP) 1%, para dismutases do superóxido (SOD), catalases (CAT) e peroxidases (POX) (Peixoto et al., 1999);
- Tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0, EDTA 1,0 mM, ácido ascórbico (AA) 1,0 mM, PMSF 1 mM, ditioneitol (DTT) 2 mM e PVPP 1% (p/v), para peroxidases do ascorbato (APX) (Peixoto et al., 1999);

Após centrifugação a $12.000 \times \text{g}$ por 15 min, a 4°C , os sobrenadantes foram utilizados como extrato enzimático bruto e as atividades enzimáticas determinadas pela adição do extrato aos seguintes meios de reação:

- Tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) $75 \mu\text{M}$, EDTA 0,1 mM e riboflavina $2 \mu\text{M}$, para SOD (Giannopolitis e Ries, 1977);

- Tampão fosfato de potássio 50 mM, H₂O₂ 12,5 mM, para CAT (Peixoto et al., 1999);
- Tampão de fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, pirogalol 20 mM e H₂O₂ 20 mM, para POX (Peixoto et al., 1999);
- Tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,0, ácido ascórbico 0,8 mM e H₂O₂ 1 mM, para APX (Peixoto et al., 1999);

Para determinação da atividade da SOD, 50 µL do extrato enzimático bruto fora adicionado a 2,95 mL do meio de reação. A reação foi conduzida a 25 °C, numa câmara de reação sob iluminação de uma lâmpada fluorescente de 15 W, mantida no interior de uma caixa coberta com papel alumínio. Após 5 minutos de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e determinada a absorvância a 560 nm, da formazana azul produzida pela fotorredução do NBT. A absorvância a 560 nm de um meio de reação exatamente igual ao anterior, mas mantido no escuro por igual período, serviu de branco e foi subtraído da leitura da amostra que recebeu iluminação (Giannopolitis e Ries, 1977). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT, sendo os resultados expressos em U SOD mg⁻¹ prot min⁻¹ (Beauchamp e Fridovich, 1971).

A atividade da CAT foi determinada pela adição de 100 µL do extrato enzimático bruto a 2,9 mL de meio de reação. O decréscimo na absorvância, no primeiro minuto de reação, foi medido a 240 nm, a 25 °C. A atividade enzimática foi calculada utilizando o coeficiente de absorvância molar de 36 M⁻¹ (Peixoto et al., 1999), e o resultado expresso em µmol de H₂O₂ mg⁻¹ prot min⁻¹.

A atividade da POX foi estimada pela adição de 100 µL do extrato enzimático bruto a 4,9 mL do meio de reação. A produção de purpurogalina foi determinada pelo incremento na absorvância, durante o primeiro minuto de reação, a 420 nm, a 25 °C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de absorvância molar 2,47 mM⁻¹ (Peixoto et al., 1999) e os resultados expressos em µmol de purpurogalina mg⁻¹ prot min⁻¹.

A atividade da APX foi determinada pela adição de 100 µL do extrato enzimático bruto a 2,9 mL do meio de reação. O decréscimo na absorvância a 290 nm, a 25°C, foi medido durante o primeiro minuto da reação. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de absorvância molar de 2,8 mM⁻¹ (Peixoto et al., 1999) e expressa em µmol de ácido ascórbico (AA) mg⁻¹ prot min⁻¹.

Proteínas

Para quantificação da concentração de proteínas, usadas para base da atividade enzimática, seguiu-se o método proposto por Bradford (1976). Em 100 μL do extrato enzimático bruto, adicionou-se 1 mL do reagente de Bradford. Após 20 min de reação no escuro, a absorbância a 595 nm foi determinada e os teores de proteínas foram estimados com base em curva de calibração preparada com padrões de BSA.

Sistema antioxidante não enzimático

Glutationa total

Para determinação do teor de glutathione total, amostras de 0,3 g de folhas e raízes, coletadas após 3 horas do reestabelecimento do período luminoso e armazenadas em freezer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, foram homogeneizadas em meio de extração constituído de HCl 0,1 M, com EDTA 1 mM, e centrifugadas a 12000 x g, por 15 min, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Aliquotas de 100 μL do sobrenadante foram adicionadas a meio de reação constituído de tampão fosfato de sódio 125 mM, com EDTA 6,3 mM, pH 7,5, reagente de Ellman [(ácido 5,5' – ditio-bis (2-nitrobenzóico)] 6 mM, NADPH 0,3 mM, e incubados a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 5 min, seguido de adição de 10 μL de enzima redutase da glutathione (50 U mL^{-1}). A absorbância foi determinada a 412 nm, durante o primeiro minuto de reação (Anderson, 1985) e a concentração de glutathione determinada por meio de curva de calibração previamente estabelecida, sendo os resultados expressos em $\text{nmol GSH g}^{-1}\text{ MF}$.

Ascorbato total

Na determinação da concentração de ascorbato total, amostras de 0,3 g de folhas e raízes, coletadas após 3 horas do reestabelecimento do período luminoso e armazenadas em freezer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 2 mL de TCA 6% (p/v), centrifugadas a 15000 x g por 5 min, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. À alíquota de 200 μL do sobrenadante adicionaram-se 400 μL de tampão fosfato de sódio 0,2 M, pH 7,4 e 200 μL de DTT. A mistura ficou em repouso por 15 min antes de ser acrescida de 200 μL de N-etilmaleimida 0,5% (p/v), 1 mL de TCA 10% (p/v), 800 μL de ácido fosfórico 42 % (v/v), 800 μL de 2-dipiridil 4% (p/v) e 400 μL de cloreto de ferro (III) 3% (p/v). Após agitação vigorosa e incubação a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 45 min, a reação foi paralisada em banho de gelo e a absorbância determinada a 525 nm (Kampfenkel et al., 1995). Os teores de ascorbato total foram estimados com base em curva de calibração preparada com padrões autênticos de ascorbato, tendo sua concentração expressa em $\mu\text{mol de AA g}^{-1}\text{ MF}$.

Compostos tiolados

Amostras de 150 mg de folhas e raízes, coletadas após 3 horas do reestabelecimento do período luminoso e armazenadas em freezer -80 °C, foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 2 mL de meio de extração constituído de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, EDTA 1 mM e ácido ascórbico 1% (p/v), seguido de centrifugação a 10000 x g, por 10 min, a 4 °C, sendo o sobrenadante utilizado para determinação de tióis totais e não proteicos.

Para tióis totais, alíquotas de 250 µL do sobrenadante foram adicionadas a 750 µL de tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 8,2, 50 µL do reagente de Ellman [ácido 5,5' – ditio-bis (2-nitrobenzóico)] 0,01 M e 3,95 mL de metanol (Sedlak e Lindasay, 1968). Após 15 min de reação a 37 °C, a absorbância foi determinada a 412 nm e, utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar 13100 M⁻¹, foi calculado o teor de tióis totais e os resultados expressos em µmol de SH g⁻¹ MF.

Para determinação dos tióis não-proteicos, alíquotas de 1 mL dos sobrenadantes foram adicionadas a 0,2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 50% (p/v) e 0,8 mL de H₂O desionizada, seguido de centrifugação a 10000 x g durante 15 min. Às alíquotas de 1 mL do sobrenadante foram adicionados 2 mL de tampão Tris-HCl 0,4 M, pH 8,9 e 50 µL de reagente de Ellman 0,01 M. Após 5 min à temperatura ambiente, a absorbância foi lida a 412 nm e, utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar de 13100 M⁻¹, calculou-se o teor de tióis não-proteicos, sendo os resultados expressos em µmol de SH g⁻¹ MF (Sedlak e Lindasay, 1968).

Desenho experimental e análise estatística

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo 4 tratamentos com 4 repetições, e cada unidade experimental constituída de 2 plantas/repetição. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, por meio do programa estatístico R (R CORE TEAM, 2014).

RESULTADOS

Concentração de As, Si e taxa de crescimento relativo

Nas raízes, o teor de As acumulado nas plantas contidas no tratamento +As+Si foi 34% maior que plantas expostas a tratamentos apenas com As. Diferentemente do que ocorreu nas raízes, nas folhas a maior concentração do metaloide se deu no tratamento apenas com As, com aumento de 36%, quando comparados as plantas expostas ao tratamento +As+Si. A exposição e, conseqüente acúmulo de As por *P. stratiotes*, resultou em diminuição significativa na TCR, levando a planta a perda de massa, principalmente devido à abscisão de raízes (Figura 1). As plantas que foram submetidas ao tratamento com As associado ao Si retomaram o seu crescimento, embora inferior (57% menor), àquelas do controle. A concentração de Si teve incremento de 74% em folhas e 50% em raízes nas plantas expostas ao tratamento com adição de Si. Plantas expostas concomitantemente a As e Si apresentaram 12% e 9% de incremento na concentração de Si em folhas e raízes respectivamente, quando comparadas às plantas do controle. Plantas tratadas apenas com As apresentaram redução nas concentrações de Si tanto em folhas (10%) quanto em raízes (17%) (Tabela 1).

Tabela 1. Acúmulo de arsênio (As), silício (Si) e taxa de crescimento relativo (TCR) em *Pistia stratiotes*. Médias, e seus respectivos erros padrões, seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Tratamento	TCR mg g ⁻¹ MF dia ⁻¹	[As] µg g ⁻¹ MS		[Si] mg g ⁻¹ MS	
		Folha	Raiz	Folha	Raiz
Controle	20,72 ± 0,9 a	nd	nd	1,71 ± 0,093 b	2,57 ± 0,118 c
+ Si	19,90 ± 2,79 a	nd	nd	2,84 ± 0,119 a	3,88 ± 0,185 a
+ As	-25,07 ± 1,36 c	96,90 ± 3,98 a	298,53 ± 26,73 b	1,45 ± 0,081 c	2,14 ± 0,062 d
+ Si + As	9,07 ± 2,21 b	71,16 ± 10,75 b	400,19 ± 42,15 a	1,83 ± 0,069 b	2,81 ± 0,095 b

nd, (não detectado)

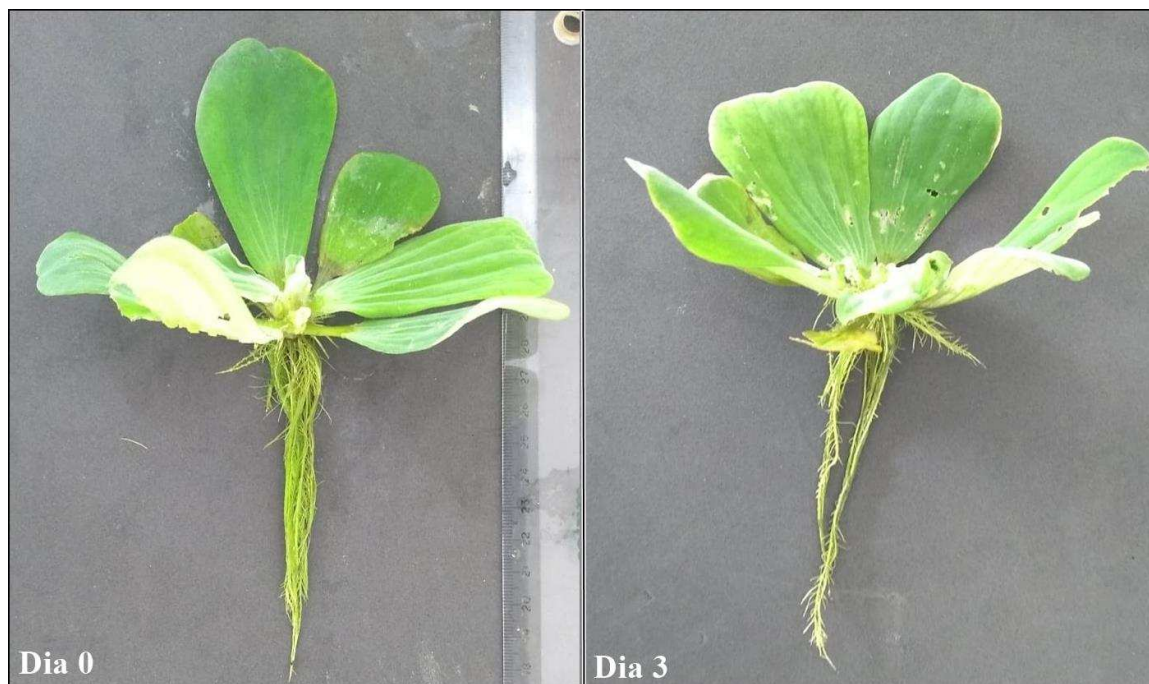


Figura 1. Aspecto visual de folhas e raízes de *P. stratiotes* expostas ao As.

Parâmetros fotossintéticos, fluorescência da clorofila a e pigmentos

A exposição de *P. stratiotes* ao As desencadeou redução nos teores dos pigmentos fotossintéticos. A concentração dos pigmentos clorofila a e b diminuiu significativamente em plantas submetidas ao tratamento apenas com As. Já plantas submetidas ao tratamento contendo As e Si, os efeitos tóxicos sobre os pigmentos foram reduzidos, apresentando concentrações semelhantes àsquelas em plantas do controle. Para os teores de carotenoides, não houve diferença significativa entre os indivíduos tratados com +As, +Si+As, +Si e do controle (Figura 2).

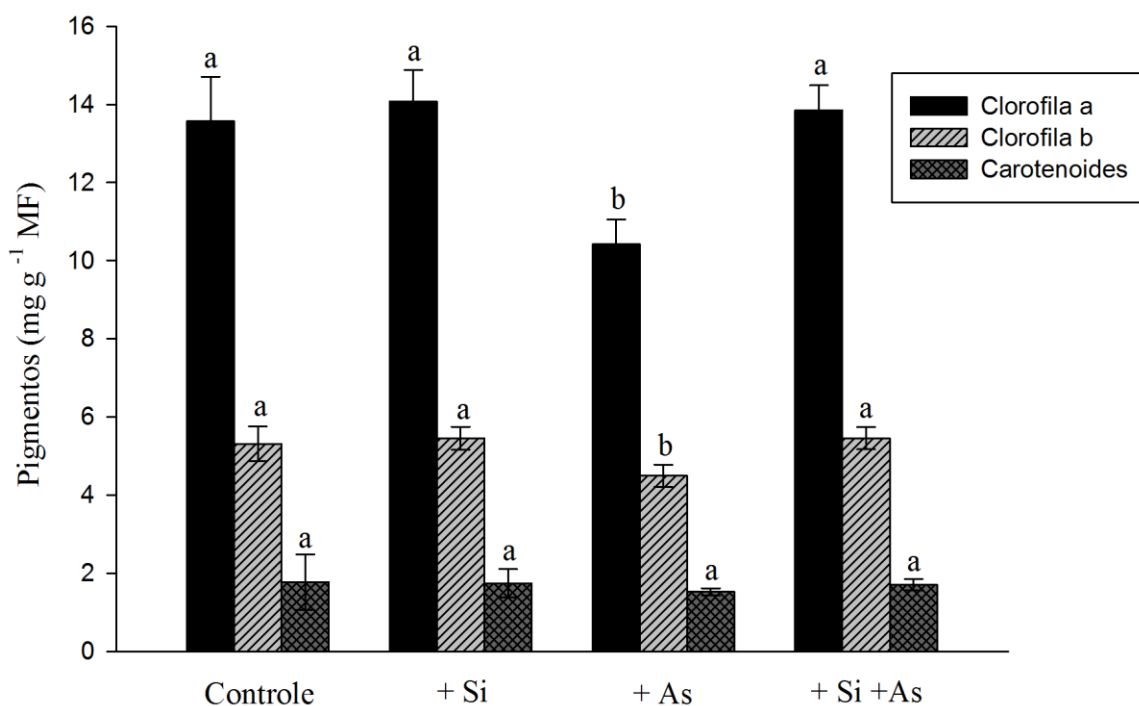


Figura 2. Efeito do arsênio (As) e do silício (Si) sobre os teores de pigmentos em *Pistia stratiotes*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$). As barras dispostas nos gráficos representam o erro padrão.

Sobretudo, a exposição das plantas ao As foi responsável pela redução de 25% da taxa líquida de fotossíntese e 17% na g_s das plantas, quando comparadas àquelas do controle. A adição de Si na solução contendo As, por sua vez, atenuou as perdas na fotossíntese e na g_s . A C_i e E não sofreram alterações com a exposição aos tratamentos contendo As, em relação ao controle. Por outro lado, a adição do Si isolado reduziu a taxa transpiratória neste tratamento (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito do arsênio (As) e do silício (Si) sobre a taxa de fotossíntese líquida (A), condutância estomática (g_s), concentração interna de carbono (C_i) e transpiração (E) em *Pistia stratiotes*. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Tratamentos	A ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	g_s ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	C_i ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	E ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)
Controle	11,79 ± 0,4 a	0,773 ± 0,019 a	361,53 ± 3,6 a	5,70 ± 0,1 a
+ Si	12,10 ± 0,3 a	0,802 ± 0,039 a	363,42 ± 7,3 a	5,02 ± 0,3 b
+ As	8,96 ± 0,3 c	0,643 ± 0,027 b	359,43 ± 4,2 a	6,01 ± 0,1 a

+ Si + As	10,51 ± 0,4 b	0,776 ± 0,015 a	368,82 ± 6,1 a	5,82 ± 0,05 a
-----------	---------------	-----------------	----------------	---------------

Os parâmetros de fluorescência da clorofila a também foram afetados pela adição de As à solução, o que ocasionou perdas no rendimento quântico efetivo do fotossistema II (F_V/F_M'). Entretanto, plantas expostas a tratamentos com adição de Si à solução contendo As, reduziram parcialmente esses danos, contribuindo para valores que se aproximaram dos encontrados em plantas do controle (Tabela 3).

O acúmulo do As na parte aérea também gerou prejuízos na taxa de transporte de elétrons (ETR), no rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Φ PS2) e na dissipação fotoquímica (qP). Todavia, plantas submetidas a tratamento em que se associou Si ao As, tiveram redução parcial dos danos no ETR, sem que os demais parâmetros fossem alterados. Em relação a dissipação não fotoquímica (NPQ), não se observou diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito do arsênio (As) e do silício (Si) sobre o rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_V/F_M'), rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Φ PSII), taxa de transporte de elétrons (ETR), dissipação não fotoquímica (NPQ) e dissipação fotoquímica (qP) em *Pistia stratiotes*. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

Tratamentos	F_V/F_M'	Φ PS2	ETR	NPQ	qP
Controle	0,783 ± 0,01 a	0,2031 ± 0,03 a	71,68 ± 5,8 a	0,556 ± 0,07 a	0,329 ± 0,01 a
+ Si	0,782 ± 0,003 a	0,2016 ± 0,01 a	76,88 ± 6,1 a	0,554 ± 0,02 a	0,329 ± 0,01 a
+ As	0,759 ± 0,005 c	0,1696 ± 0,01 b	57,58 ± 3,0 c	0,436 ± 0,11 a	0,263 ± 0,01 b
+ Si + As	0,771 ± 0,003 b	0,1665 ± 0,01 b	63,96 ± 0,9 b	0,448 ± 0,29 a	0,266 ± 0,02 b

Espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica

Plantas expostas apenas ao As apresentaram maiores concentrações de H_2O_2 que os demais tratamentos tanto em folhas quanto em raízes. Plantas submetidas ao tratamento de As com adição do Si, apresentaram redução nos teores de H_2O_2 em folhas e raízes, observando-se valores próximo àsquelas plantas encontradas em situação de controle (Figura 3A). Plantas submetidas a tratamento com As apresentaram incremento no teor de $O_2^{\cdot-}$ nas folhas em aproximadamente 600%, enquanto plantas submetidas ao tratamento +As +Si apresentaram aumento de cerca de 48%. Nas raízes, o As levou ao aumento de 45% nos teores de $O_2^{\cdot-}$, enquanto plantas submetidas a tratamento com As associado ao Si

apresentaram um aumento de 15% quando comparados a plantas do controle (Figura 3B). O acúmulo do metaloide provocou aumento dos teores de MDA, em folhas e raízes, de plantas que foram submetidas ao tratamento contendo apenas As. Por outro lado, plantas expostas ao tratamento +As+Si apresentaram níveis de MDA semelhantes àsquelas do controle, tanto em folhas como em raízes. Plantas submetidas a tratamentos apenas com Si apresentaram valores inferiores aos do controle nos níveis de MDA em folhas e raízes (Figura 3C).

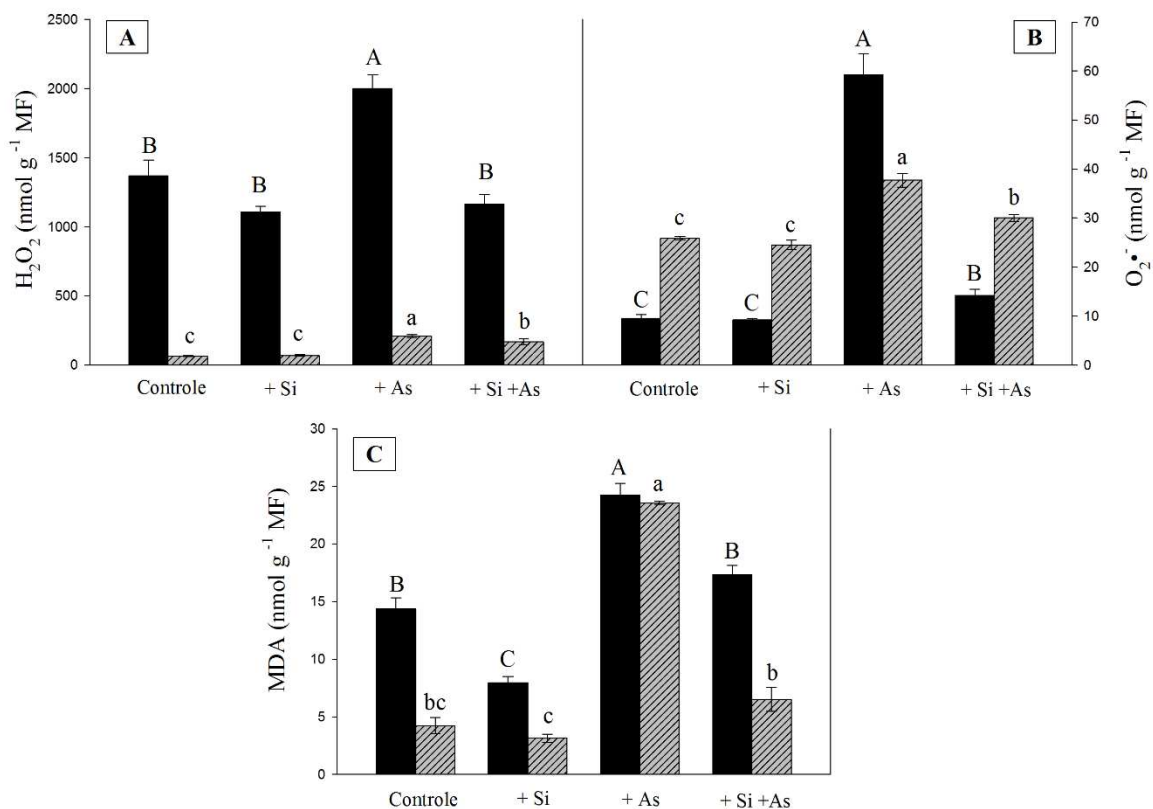


Figura 3. Alterações na concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (A), ânion superóxido (O₂^{•-}) (B) e malondialdeído (MDA) (C) em folhas (■) e raízes (▨) de *Pistia stratiotes* expostas ao arsênio (As) e ao silício (Si). Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula para folhas e minúscula para raízes, não diferem entre si pelo teste Tukey (P < 0,05). As barras dispostas nos gráficos representam o erro padrão.

Sistema antioxidante enzimático

As plantas expostas ao As, apresentaram, de modo geral, aumento nas atividades das enzimas SOD, CAT, POX e APX. Esse aumento, evidencia a resposta do sistema antioxidante ao estresse ocasionado pelo poluente. Na presença do Si, entretanto, esse

incremento foi reduzido, acompanhando o decréscimo observado nas concentrações das espécies reativas de oxigênio.

A SOD apresentou aumento significativo em sua atividade nas plantas submetidas ao tratamento com As (123% nas folhas e 47% nas raízes), quando comparados ao controle. Plantas submetidas ao tratamento +Si+As, embora tenham mantido atividades superiores àquelas do controle, promoveram redução da sua atividade quando comparadas as plantas tratadas com As isoladamente (Figura 4A).

A enzima CAT manteve elevada atividade nas folhas das plantas expostas ao As e ao As + Si, destacando que, a presença do Si não foi capaz de promover alterações na atividade dessa enzima. Nas raízes, no entanto, a maior atividade se deu naquelas plantas submetidas ao tratamento +As+Si, com valores, aproximadamente, 6 vezes maiores que àquelas do controle (Figura 4B).

Em relação a POX, plantas submetidas aos tratamentos +As e +Si+As, embora tenham apresentado incrementos em relação ao controle, da ordem de 22% e 53%, em folhas e raízes, respectivamente, não diferenciaram entre si (Figura 4C).

A enzima APX, que atua concomitantemente com as demais enzimas na decomposição do H_2O_2 em água, apresentou aumento significativo da atividade em plantas tratadas apenas com As, gerando acréscimo de 234% e 77% em folhas e raízes, respectivamente. Esses acréscimos foram significativamente menores em plantas contidas nos tratamentos com +Si+As, embora ainda maiores do que o controle (Figura 4D).

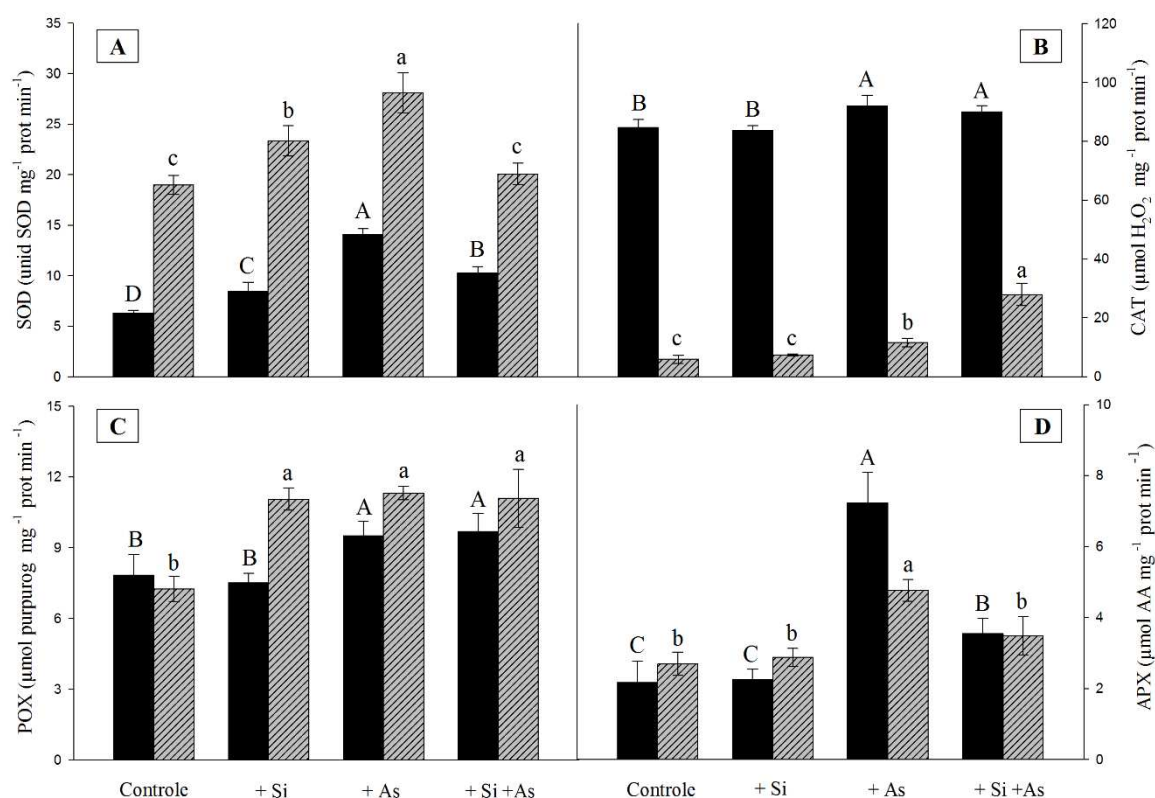


Figura 4. Efeito do arsênio (As) e do silício (Si) sobre a atividade de enzimas do sistema antioxidante em folhas (■) e raízes (▨) de *Pistia stratiotes*. (A) dismutase do superóxido (SOD), (B) catalase (CAT), (C) peroxidases (POX), (D) peroxidase do ascorbato (APX). Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula para folhas e minúscula para raízes, não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$). As barras dispostas nos gráficos representam o erro padrão.

Sistema antioxidante não-enzimático

As folhas das plantas expostas ao As tiveram redução de aproximadamente 27% na concentração de glutathione. A adição conjunta do As e Si, no entanto, manteve as concentrações similares àsquelas encontradas em plantas do controle. Nas raízes não foram observadas alterações nos níveis de glutathione relativas aos tratamentos (Figura 5A).

Os teores de ascorbato total foram reduzidos em folhas e raízes das plantas expostas ao As e ao As + Si. Nas folhas, a redução foi de 33% no tratamento apenas com As e 12% quando expostas a Si e As, comparadas a plantas do controle (Figura 5B). O comportamento persistiu nas raízes (Figura 5B), onde percebe-se redução de 24% nos teores de ascorbato em plantas tratadas apenas com o As e 12% em plantas onde se teve associação Si e As, quando comparadas àsquelas do controle.

Houve redução na concentração de tiois totais nas folhas das plantas expostas ao As, isoladamente ou em associação com o Si. A presença do Si, no entanto, promoveu recuperação na concentração dos tiois totais, mas, ainda, permanecendo menores do que o controle. Nas raízes, por sua vez, houve significativo incremento na concentração desses compostos, sem que houvesse diferença entre os tratamentos +As e +As+Si (Figura 5C). Para as concentrações de tióis não-proteicos, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos nas folhas (Figura 5D). Entretanto, nas raízes, onde se acumulou mais As, houve aumento na concentração de 46% e 65% em plantas expostas aos tratamentos +As e +Si+As, respectivamente.

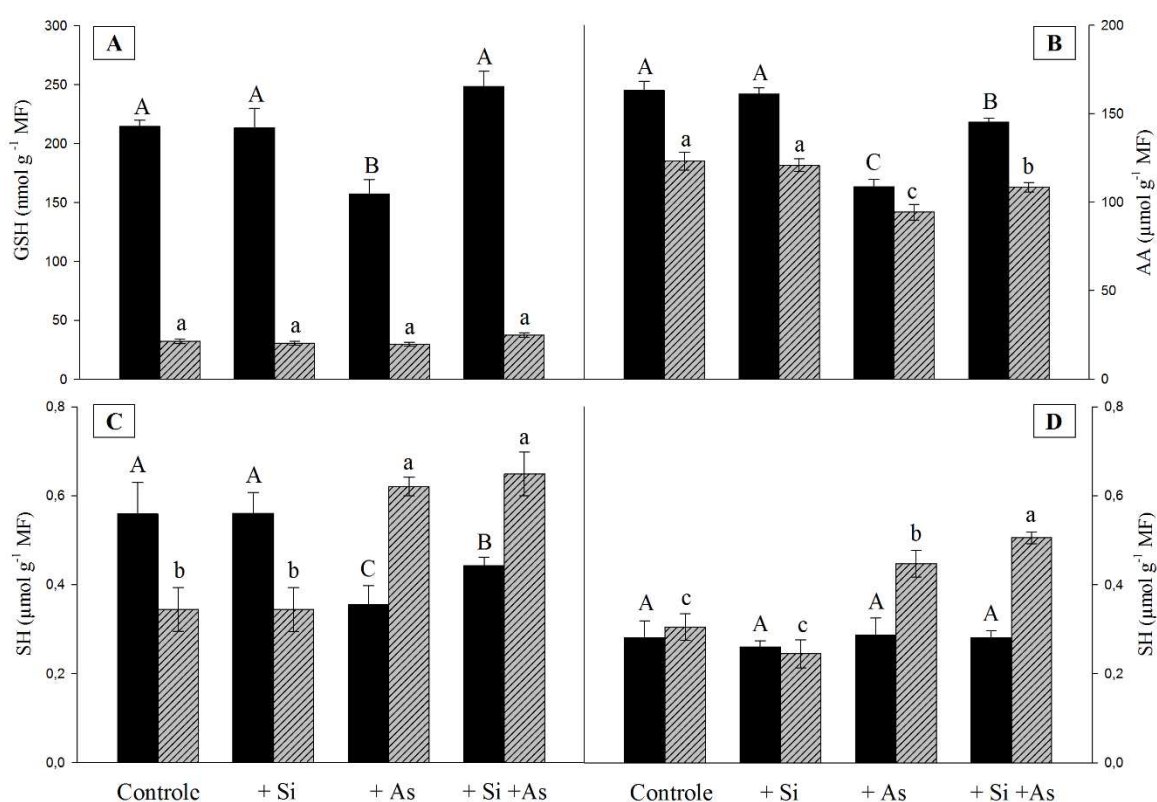


Figura 5. Efeito do arsênio (As) e do silício (Si) sobre a concentração de antioxidantes não enzimáticos em folhas (■) e raízes (▨) de *Pistia stratiotes*. (A) Glutationa, (B) Ascorbato, (C) Tióis Totais, (D) Tióis não-proteicos. Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula para folhas e minúscula para raízes, não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$). As barras dispostas nos gráficos representam o erro padrão.

DISCUSSÃO

O acúmulo de As nas plantas desencadeia, em primeiro nível, a desestabilização da homeostase celular que pode levar a redução de processos biológicos metabólicos essenciais como fotossíntese e respiração. A diminuição destes processos gera aumento de espécies reativas de oxigênio livres que, por sua vez, levam ao desequilíbrio do potencial redox das células e que são responsáveis por causar danos às proteínas, pigmentos fotossintéticos e membranas lipídicas (Armendariz et al., 2016; Cobbett, 2000; Kim et al., 2017; Tripathi et al., 2017). Entretanto, esses efeitos tóxicos foram parcialmente atenuados pela adição do Si na solução de cultivo das plantas, em função da capacidade do Si em aumentar a atividade do sistema antioxidante e, provavelmente, em compartimentalizar o metaloide em vacúolos, através do estímulo para sínteses de transportadores do tipo ABC (Briat, 2010; Hinrichis et al., 2017 e Wu et al., 2013), e parede celular, além de promover distribuição homogênea do mesmo nas folhas e retenção do metaloide na raiz (Wu et al., 2013).

As plantas expostas diretamente ao As apresentaram redução na taxa de crescimento devido a perda de raízes, como relatado por Farnese et al. (2014a), pois houve a formação de um meristema de abscisão que se torna responsável pela queda das raízes. O acúmulo deste metaloide nas raízes caracteriza-se como um mecanismo de tolerância destas plantas com a finalidade de proteger o aparato fotossintético. Por outro lado, os tratamentos que receberam adição de Si apresentaram menor efeito na taxa de crescimento, mesmo com acúmulo maior do metaloide na raiz, o que indica função mitigadora do Si, que pode ocorrer pela retenção na parede celular e/ou quelação com fitoquelatinas, transportando-o para o vacúolo, deixando-os inativos nas plantas (Wu et al., 2013).

A adição do Si, também, restringiu o transporte do As para a parte aérea, o que reduziu os danos destes metaloides nas folhas. O Si pode reduzir o transporte de metais para a parte aérea bloqueando fisicamente o fluxo de circulação apoplástica através das raízes (Shi et al., 2005) ou, possivelmente através da adsorção do arsênio às paredes celulares. Naturalmente, plantas aquáticas apresentam concentrações significativas de Si, podendo variar de 2 a 30 mg g⁻¹ MF (Schoelynck et al., 2010).

Um fator que pode ter contribuído para redução dos danos nas raízes, redução do TCR e para a diferença da concentração de Si dos tratamentos é a competição pelo sítio de absorção. No arroz, os genes Low silicon rice 1 e 2 (Lsi1 e Lsi2) codificam para isoformas

de aquaporinas, denominadas aquagliceroprininas, que atuam na absorção do Si, na forma de ácido monossilícico (H_4SiO_4) (Ma e Takahashi, 2002; Ma et al., 2006). Os altos níveis de expressão de *Lsi1* e *Lsi2* resultam, não só no maior acúmulo de Si como, também, no aumento do acúmulo de As, sugerindo que estes compartilham a mesma via de transporte.

A diminuição na concentração dos pigmentos clorofila a e b nas plantas expostas ao As está relacionada aos danos do metaloide, que afetaram tanto a biossíntese quanto a degradação destes compostos, que pode ser observado com o aparecimento de clorose. Esse é um sintoma típico do fitotoxidez do As, conforme relatado por Abbas et al. (2018) e Maglovski et al. (2019), as quais são afetadas pela substituição do átomo central de magnésio da molécula de clorofila pelo As (Yadav et al., 2016). A adição de Si fez com que as concentrações desses pigmentos se equiparassem aos teores encontrados no controle, demonstrando a importância deste elemento para a redução do estresse causado pelo As, o que pode ocorrer pelo estímulo da síntese (Adrees et al., 2015; Khan e Gupta, 2018; Sa et al., 2013) e pela redução do transporte de metal para a parte aérea, protegendo o aparato fotossintético (Song et al., 2014). Em relação aos carotenoides, não houve efeito dos tratamentos aplicados, embora efeitos do As e do Si sobre esses pigmentos sejam relatados na literatura (Emamverdian et al., 2015; Mascher et al., 2002; Tripathi et al., 2016). Os efeitos tóxicos do As no processo fotossintético podem ocorrer tanto na fase fotoquímica como na bioquímica, reduzindo a taxa de fixação de carbono e a eficiência fotoquímicas das plantas (Pandey et al., 2015; Stoeva e Bineva, 2003).

A exposição das plantas ao As reduziu a taxa de fotossíntese líquida, a condutância estomática, o rendimento quântico potencial do PSII (F_v/F_m), a taxa de transporte de elétrons (ETR), o rendimento quântico efetivo do PSII (Φ_{PSII}) e dissipação fotoquímica (qP). A recuperação da atividade fotossintética nas plantas tratadas com As e Si pode ser explicado pela ação do Si em evitar a translocação do As das raízes para a parte aérea, ocasionando redução do estresse oxidativo nas plantas e dos danos à maquinaria fotossintética, enquanto o aumento da g_s pode ser explicado pelo fato do Si promover uma melhor reorganização celular (Adrees et al., 2015 e Sanglard et al 2014, 2016).

A transpiração, processo pelo qual as plantas perdem água pelos espaços intercelulares das folhas, foi afetado exclusivamente pelo Si, uma vez que acumulado, principalmente nas paredes celulares das folhas, forma uma dupla camada de cutícula e Si (Mitani e Ma, 2005) e consequente aumento da espessura da parede celular, reduz a transpiração excessiva (Naeem et al., 2018).

Os decréscimos no rendimento quântico potencial do fotossistema II e da taxa de transporte de elétrons demonstram os efeitos tóxicos do poluente na atividade fotoquímica do processo fotossintético, conforme relatos de Li et al. (2014), Piršelová et al. (2016) e Wang et al. (2016). A redução desses danos em face da adição do Si deve-se à restrição do transporte do As para as folhas, por meio de quelação no citosol e bloqueio físico apoplástico nas raízes (Tripathi et al., 2016).

A energia capturada por uma molécula de clorofila pode ser utilizada na fotossíntese (qP), ser emitida como fluorescência ou ser convertida em calor (parte não fotoquímica). A dissipação fotoquímica (qP), que é a utilização da energia para a etapa fotoquímica da fotossíntese, sofreu redução com o acúmulo de As pelas plantas, inclusive nos tratamentos de As com adição de Si. A dissipação não fotoquímica (NPQ), que compõe a energia que não é utilizada para processos fotoquímicos e, em sua maior forma é a produção de calor na forma de radiação infravermelha, não sofreu alteração com a aplicação dos tratamentos. A adição de Si à solução contendo As não foi capaz de mitigar as alterações sofridas pelas plantas. Trabalhos realizados por Li et al. (2014) e Tripathi et al. (2016), com As e Cd, respectivamente, demonstraram redução na qP. Entretanto, pesquisas realizadas por Maghsoudi et al. (2015) demonstraram que a suplementação de Si em plantas sob estresse reduziu a dissipação energética não fotoquímica, com aumento da dissipação fotoquímica e da ETR, evidenciando o papel protetor do Si ao aparelho fotossintético.

O rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Φ_{PSII}) foi reduzido nas plantas expostas ao As, sem que o Si tenha promovido a atenuação desse dano. Estes resultados indicam efeitos tóxicos do As no centro de reação dos fotossistemas, conforme demonstrado, também, para outros metais pesados (Li et al., 2014; Song et al., 2014; Stoeva e Bineva, 2003; Wang et al., 2016).

A exposição das plantas ao As aumentou a concentração das ROS, tanto em folhas como em raízes, o que promoveu o aumento da peroxidação dos lipídios, demonstrado pela formação do MDA. Dessa forma, isso se torna um bom indicador de resposta ao estresse causado por As, conforme relatado por Farnese et al. (2014b) em *P. stratiotes* e Andrade et al. (2012) em *Eichhornia crassipes*.

O tratamento com adição de Si à solução contendo As reduziu os danos causados pelo metaloide, sugerindo que a aplicação exógena deste elemento esteja envolvida no metabolismo de mitigação dos danos das ROS, seja por estímulo do sistema antioxidante

ou por compartimentalização. Portanto, a compartimentalização de metais pesados em componentes que são menos ativos metabolicamente, como as paredes celulares e vacúolos, é um mecanismo importante para a tolerância mediado por Si em plantas (Liu et al., 2009; Maksimovic et al., 2012; Ye et al., 2012), assim como a diminuição da permeabilidade das membranas plasmáticas das células, melhorando a estabilidade lipídica e impedindo a deterioração das suas estruturas e funções (Cao et al., 2015; Shi et al., 2005; Wu et al., 2017).

A eliminação dos ROS é o mecanismo de defesa mais importante para lidar com as condições de estresses pelas plantas (Kim et al., 2017). Para tal, vegetais superiores dispõem de sistemas antioxidantes que são divididos em duas partes: i) enzimáticos, via ação de enzimas como SOD, CAT, POX, APX, GR e outras; ii) não enzimáticos, que são compostos de baixo peso molecular que funcionam como antioxidantes, tais como: AA, glutathiona, compostos tiolados.

A atividade das enzimas SOD, CAT, POX e APX são altamente especializadas, com utilização sequencial de produtos e substratos, demonstrando que essas enzimas são determinantes para conferir maior tolerâncias às plantas expostas a condições de estresse.

A SOD catalisa a reação de conversão do íon superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio, sendo considerada o mecanismo de defesa mais importante contra ROS (Geng et al., 2018). A exposição ao As e, como consequência, aumento da produção de ROS, em especial o $O_2^{\cdot-}$, fez aumentar a atividade da SOD. Em associação ao Si, a redução da atividade desta enzima se deve aos menores teores de $O_2^{\cdot-}$ apresentados. Incrementos na participação dessa enzima em resposta à toxidez por As ocorre, também, em outras espécies vegetais, como alface (Gusman et al., 2013) e soja (Armendariz et al., 2016).

A CAT é considerada uma enzima básica na remoção de H_2O_2 das células, já que catalisa a transformação de H_2O_2 em água e oxigênio. Portanto, a CAT tem a sua atividade aumentada consideravelmente quando a planta se encontra em estresse oxidativo (Wang et al., 2014). Em *P. stratiotes*, a exposição ao As promoveu aumento da atividade da CAT nas folhas e raízes, entretanto, o efeito do Si foi observado apenas nas raízes, onde ocorreu ativação da enzima e/ou sinalização para a síntese da CAT.

O aumento da atividade das enzimas POX e APX nos tratamentos com As seguem o aumento nas concentrações de ROS, em especial o H_2O_2 . A atividade da POX, em plantas expostas ao tratamento contendo As e Si, manteve-se alta mesmo com redução

expressiva das concentrações de peróxido de hidrogênio, o que indica importante função do Si na ativação e melhoria na atividade desta enzima (Bhat et al., 2019). A APX apresentou redução na atividade no tratamento +Si+As, quando comparado apenas com o tratado com As, sugerindo que a participação de outros antioxidantes foi mais eficiente nesses tratamentos e/ou que a ação benéfica do Si se deu na imobilização do As ou por induzir a síntese de compostos antioxidantes não enzimáticos, responsáveis por consequente redução dos seus danos (Emamverdian et al., 2018).

Como parte do sistema antioxidante não enzimático, o ascorbato desponta como uma das principais moléculas de defesa nas plantas, desempenhando papel importante na defesa contra ROS. Ele pode agir diretamente nas ROS ou pode ser substrato para a APX que, através do ciclo ascorbato-glutationa, é responsável pela eliminação de H_2O_2 (Li et al., 2012). Plantas expostas a tratamento com As reduziram a concentração de ascorbato total nas plantas, o que sugere que a exposição ao metaloide leva ao esgotamento desta substância, seja pelo aumento de ROS que precisam ser combatidas ou pela inibição na síntese causada pelo estresse sofrido (Li et al., 2012; Q. Shi et al., 2005; Wu et al., 2013). A adição do Si ao tratamento com As fez aumentar os teores de ascorbato em relação ao tratamento apenas com As. Esta resposta nas plantas pode ser explicada pela redução dos teores de ROS, provocada pela inibição e complexação do As, que levou também a menor atividade da enzima APX, que usa o ascorbato como doador de elétron, ou ainda por estímulo na sua biossíntese (Ashfaque et al., 2017; Bhat et al., 2019; Wang et al., 2014).

Uma das principais rotas metabólicas para desintoxicação das plantas envolve a complexação dos metais a compostos ricos em enxofre, como fitoquelatinas, glutaciona, compostos tiolados. Essa complexação reduz o As livre no citosol reduzindo, assim, os seus danos celulares. O aumento dos teores de tióis totais nas raízes e redução nas folhas, acompanhou a maior concentração de As, indicando maior quelação e, consequente inativação, nesta parte da planta. Entretanto, a adição do Si ao tratamento com As gerou incremento nos teores de tióis totais nas folhas, que demonstra o papel estimulante do Si na síntese deste componente.

Os tióis não-proteicos, constituído em sua maior parte por fitoquelatinas e glutaciona, apresentaram aumento na sua concentração nas raízes de plantas expostas aos tratamentos contendo As e, sobretudo, em plantas submetidas a tratamento do metaloide suplementado com Si. Entretanto, como os teores de glutaciona permaneceram inalterados, o aumento dos teores de tióis não-proteicos deve-se exclusivamente pelo aumento na

síntese de fitoquelatinas, que atua imobilizando o As e impedindo a sua ação tóxica. Estudos demonstraram que suplementação por Si em *Arabidopsis thaliana*, sob estresse por cobre, aumentou a expressão do gene fitoquelatina sintase (PCS1), responsável pela síntese de fitoquelatinas (Bhat et al., 2019), sendo esse um dos mecanismos de defesa das plantas contra o estresse (Khandekar e Leisner, 2011).

A glutathione (GSH) é uma das principais fontes de tióis não proteicos nos tecidos vegetais, atuando na formação de quelantes de metais (fitoquelatinas) e, também, na eliminação de H_2O_2 , através do ciclo ascorbato-glutathione (Geng et al., 2018). Plantas submetidas a tratamentos apenas com As reduziram os teores de glutathione nas folhas, o que pode ser devido à sua conversão em fitoquelatinas ou no seu envolvimento na regeneração do ascorbato no ciclo glutathione-ascorbato (Emamverdian et al., 2015; Hossain et al., 2012). O aumento na concentração de glutathione em folhas de plantas suplementadas com Si, indica estímulo do sistema antioxidante não enzimático, demonstrando que o mesmo pode estar envolvido na rota de biossíntese (Bhat et al., 2019; Rahman et al., 2017).

CONCLUSÕES

Plantas da espécie *P. stratiotes* acumularam elevadas concentrações de arsênio (As), principalmente nas raízes, que foi incrementada pela exposição adicional ao silício (Si). A planta apresentou redução no seu crescimento, principalmente pelas perdas de raízes, elevadas concentrações de espécies reativas de oxigênio, danos nas membranas, redução nas taxas fotossintéticas e rendimento dos fotossistemas. Entretanto, se evidenciou uma importante forma de resistir ao estresse, através da utilização dos seus mecanismos de defesa antioxidantes que tiveram as suas atividades e níveis aumentados visando a eliminação das ROS. As folhas, embora com menores concentrações de As, apresentaram as maiores concentrações de ROS e de MDA e, por consequência, maior atividade do sistema antioxidante, o que demonstra a tentativa da planta em proteger o aparato fotossintético.

Por fim, infere-se que a adição de silício aos tratamentos com As mitigou a maioria dos danos causados pelo metaloide nas plantas, em função, principalmente, do estímulo dos seus sistemas antioxidantes e imobilização do metaloide. Embora os resultados demonstrem que houve maior acúmulo de metaloide nas raízes, os efeitos sobre crescimento relativo das plantas, os danos oxidativos às membranas e o metabolismo fotossintético e fluorescência da clorofila a foram parcialmente ou integralmente mitigados pela suplementação com Si. Com isso, a suplementação com Si se mostra bastante promissora para aumentar o potencial fitorremediador desta planta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, G., Murtaza, B., Bibi, I., Shahid, M., Niazi, N.K., Khan, M.I., Amjad, M., 2018. Arsenic uptake, toxicity, detoxification, and speciation in plants: physiological, biochemical, and molecular aspects. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 15, 1–45.
- Adrees, M., Ali, S., Rizwan, M., Zia-ur-rehman, M., Ibrahim, M., Abbas, F., Farid, M., Farooq, M., Kashif, M., 2015. Mechanisms of silicon-mediated alleviation of heavy metal toxicity in plants: A review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 119, 186–197.
- Anderson, M.E., 1985. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol.* 113, 548–555.
- Andrade, H.M., Oliveira, J.A., Farnese, F.S., Ribeiro, C., Silva, A.A., Campos, F. V, 2012. Arsenic toxicity: cell signalling and the attenuating effect of nitric oxide in *Eichhornia crassipes*. *Biol. Plant.* 60, 173–180.
- Armendariz, A.L., Talano, M.A., Travaglia, C., Reinoso, H., Wevar, A.L., Agostini, E., 2016. Arsenic toxicity in soybean seedlings and their attenuation mechanisms. *Plant Physiol. Biochem.* 98, 119–127.
- Ashfaq, F., Inam, A., Inam, A., Iqbal, S., Sahay, S., 2017. Response of silicon on metal accumulation, photosynthetic inhibition and oxidative stress in chromium-induced mustard (*Brassica juncea* L.). *South Afr J. Bot.* 111, 153–160.
- Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44, 276–287.
- Bhat, J.A., Shivaraj, S.M., Singh, P., Navadagi, D.B., 2019. Role of silicon in mitigation of heavy metal stresses in crop plants. *Plants* 8, 1–20.
- Boveris, A., Alvarez, S., Bustamante, J., Valdez, L., 2002. Measurement of superoxide radical and hydrogen peroxide production in isolated cells and subcellular organelles. *Methods Enzymol.* 349, 280–287.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Briat, J.-F., 2010. Arsenic tolerance in plants: “Pas de deux” between phytochelatin synthesis and ABCC vacuolar transporters. *PNAS* 107, 20853–20854.
- Camargo, M.S. De, Pereira, H.S., Korndörfer, G.H., Queiroz, A.A., Borges, C., 2007. Soil reaction and absorption of silicon by rice. *Sci. Agric.* 64, 176–180.
- Cao, B., Ma, Q., Zhao, Q., Wang, L., Xu, K., 2015. Effects of silicon on absorbed light allocation, antioxidant enzymes and ultrastructure of chloroplasts in tomato leaves under simulated drought stress. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 194, 53–62.
- Clark, R.B., 1975. Characterization of phosphatase of intact maize roots. *J. Agric. Food Chem.* 23, 458–460.
- Cobbett, C.S., 2000. Update on heavy metal stress phytochelatin and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol.* 123, 825–832.

- Dallagnol, L.J., Rodrigues, F.A., DaMatta, F.M., Mielli, M.V.B., Pereira, S.C., 2011. Deficiency in silicon uptake affects cytological, physiological, and biochemical events in the rice – *Bipolaris oryzae* interaction. *Phytopathology*. 101, 92–104.
- DaMatta, F.M., Loos, R.A., Silva, E.A., Loureiro, M.E., 2002. Limitations to photosynthesis in *Coffea canephora* as a result of nitrogen and water availability. *J. Plant Nutr.* ISSN 975–981.
- Emamverdian, A., Ding, Y., Mokhberdoran, F., Xie, Y., 2015. Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. *Sci. World J.* 2015, 1–18.
- Emamverdian, A., Ding, Y., Xie, Y., Sangari, S., 2018. Silicon mechanisms to ameliorate heavy metal stress in plants. *Biomed Res. Int.* 2018, 1–10.
- Farnese, F.S., Oliveira, J.A., Lima, F.S., Leão, G.A., Gusman, G.S., Silva, L.C., 2014a. Evaluation of the potential of *Pistia stratiotes* L. (water lettuce) for bioindication and phytoremediation of aquatic environments contaminated with arsenic. *Braz J. Biol.* 74, 103–112.
- Farnese, F.S., Verde, R., Oliveira, J., Gusman, G.S., Silveira, N.M., 2014b. Effects of adding nitroprusside on arsenic stressed response of *Pistia stratiotes* L. under hydroponic conditions. *Int. J. Phytoremediation* 16, 123–137.
- Farooq, M.A., Islam, F., Yang, C., Nawaz, A., 2018. Methyl jasmonate alleviates arsenic-induced oxidative damage and modulates the ascorbate – glutathione cycle in oilseed rape roots. *Plant Growth Regul.* 84, 135–148.
- Gay, C., Gebicki, J.M., 2000. A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xylenol orange hydroperoxide assay. *Anal. Biochem.* 284, 217–220.
- Geng, A., Wang, X., Wu, L., Wang, F., Wu, Z., Yang, H., Chen, Y., Wen, D., Liu, X., 2018. Silicon improves growth and alleviates oxidative stress in rice seedlings (*Oryza sativa* L.) by strengthening antioxidant defense and enhancing protein metabolism under arsenic acid exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 158, 266–273.
- Giannopolitis, C.N., Ries, S.K., 1977. Superoxide dismutases: occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* 59, 309–314.
- Gratão, P.L., Prasad, M.N. V., Cardoso, P.F., Lea, P.J., Azevedo, R.A., 2005. Phytoremediation: green technology for the clean up of toxic metals in the environment. *Braz J. Plant Physiol.* 17, 53–64.
- Gusman, G.S., Oliveira, J.A., Jose, F.S.F., 2013. Arsenate and arsenite: the toxic effects on photosynthesis and growth of lettuce plants. *Acta Physiol. Plant.* 35, 1201–1209.
- Helleday, T., Nilsson, R., Jensen, D., 2000. Arsenic [III] and heavy metal ions induce intrachromosomal homologous recombination in the *hprt* gene of V79 Chinese hamster cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 114–122.
- Hinrichs, M., Fleck, A.T., Biedermann, E., Ngo, N.S., Schreiber, L., Schenk, M.K., 2017. An ABC transporter is involved in the silicon-induced formation of casparian bands in the exodermis of rice. *Front. Plant Sci.* 8, 1–11.
- Hodges, D.M., DeLong, J.M., Forney, C.F., Prange, R.K., 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant

- tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* 207, 604–611.
- Hossain, M.A., Piyatida, P., Teixeira, J.A., Fujita, M., 2012. Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methylglyoxal and in heavy metal chelation. *J. Bot.* 2012, 1–37.
- Hunt, R., 1978. *Plant growth analysis. Studies in Biology No. 96.* Edward Arnold, London. p. 67.
- IBRAM - Instituto Brasileiro de Mineração (2018). Acesso em 20 de Março de 2019 <<https://portaldamineracao.com.br/wp-content/uploads/2018/02/economia-mineral-brasil-mar2018-1.pdf?x73853>>.
- Kampfenkel, K., Van Montagu, M., Inzé, D., 1995. Extraction and determination of ascorbate and dehydroascorbate from plant tissue. *Anal. Biochem.* 225, 165–167.
- Khan, E., Gupta, M., 2018. Arsenic – silicon priming of rice (*Oryza sativa* L.) seeds influence mineral nutrient uptake and biochemical responses through modulation of Lsi-1 , Lsi-2 , Lsi-6 and nutrient transporter genes. *Sci. Rep.* 8, 1–16.
- Khandekar, S., Leisner, S., 2011. Soluble silicon modulates expression of *Arabidopsis thaliana* genes involved in copper stress. *J. Plant Physiol.* 168, 699–705.
- Kim, Y., Khan, A.L., Waqas, M., Lee, I., Lee, I., 2017. Silicon regulates antioxidant activities of crop plants under abiotic-induced oxidative stress: a review. *Front. Plant Sci.* 8, 1–7.
- Kumar, S., Shanker, R., Deo, R., Chakrabarty, D., Kumar, P., 2015. Omics and biotechnology of arsenic stress and detoxification in plants: current updates and prospective. *Environ. Int.* 74, 221–230.
- Kuo, M.C., Kao, C.H., 2003. Aluminium effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. *Biol. Plant.* 46, 149–152.
- Li, P., Song, A., Li, Z., Fan, F., 2012. Silicon ameliorates manganese toxicity by regulating manganese transport and antioxidant reactions in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Soil* 354, 407–419.
- Li, S., Yang, W., Yang, T., Chen, Y., Ni, W., 2014. Effects of cadmium stress on leaf chlorophyll fluorescence and photosynthesis of *Elsholtzia argyi* — a cadmium accumulating plant. *Int. J. Phytorem* 17, 85–92.
- Liang, Y., Yang, C., Shi, H., 2006. Effects of silicon on growth and mineral composition of barley grown under toxic levels of aluminum. *J. Plant Nutr.* 24, 229–243.
- Liu, J., Lin, S., Xu, P., Wang, X., Bai, J., 2009. Effects of exogenous silicon on the activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in chilling-stressed cucumber leaves. *Agric. Sci. China* 8, 1075–1086.
- Ma, J.F., Takahashi, E., 2002. *Soil, fertilizer, and plant silicon research in Japan*, 1st ed. Elsevier Science.
- Ma, J.F., Tamai, K., Yamaji, N., Mitani, N., Konishi, S., Katsuhara, M., Ishiguro, M., Murata, Y., Yano, M., 2006. A silicon transporter in rice. *Nature* 440, 688–691.

- Maghsoudi, K., Emam, Y., Ashraf, M., 2015. Influence of foliar application of silicon on chlorophyll fluorescence, photosynthetic pigments, and growth in water-stressed wheat cultivars differing in drought tolerance. *Turk. J. Bot* 39, 625–634.
- Maglovski, M., Gerši, Z., Rybanský, L., Bardáčová, M., Moravčíková, J., Bujdoš, M., Dobrikova, A., Apostolova, E., Kraic, J., Blehová, A., Matušíková, I., 2019. Effects of nutrition on wheat photosynthetic pigment responses to arsenic stress. *Polish J. Environ. Stud.* 28, 1821–1829.
- Maksimovic, J.D., Mojovic, M., Maksimovic, V., Romheld, V., Nikolic, M., 2012. Silicon ameliorates manganese toxicity in cucumber by decreasing hydroxyl radical accumulation in the leaf apoplast. *J. Exp. Bot.* 63, 2411–2420.
- Marin, A.R., Pezeshki, S.R., Masschelen, P.H., Choi, H.S., 1993. Effect of dimethylarsenic acid (dmaa) on growth, tissue arsenic, and photosynthesis of rice plants. *J. Plant Nutr.* 16, 865–880.
- Mascher, R., Lippmann, B., Holzinger, S., Bergmann, H., 2002. Arsenate toxicity: effects on oxidative stress response molecules and enzymes in red clover plants. *Plant Sci.* 163, 961–969.
- Menegale, M.L.C., Castro, G.S.A., Mancuso, M.A.C., 2015. Silício: interação com o sistema solo-planta. *J. Agron. Sci.* 4, 435–454.
- Mitani, N., Ma, J.F., 2005. Uptake system of silicon in different plant species. *J. Exp. Bot.* 56, 1255–1261.
- Mohammadi, M., Karr, A.L., 2001. Superoxide anion generation in effective and ineffective soybean root nodules. *J. Plant Physiol.* 158, 1023–1029.
- Naeem, A., Zia-ur-rehman, M., Akhtar, T., Hussan, M., Aslam, M., 2018. Silicon nutrition lowers cadmium content of wheat cultivars by regulating transpiration rate and activity of antioxidant enzymes. *Environ. Pollut.* 242, 126–135.
- Ozturk, F., Duman, F., Leblebici, Z., Temizgul, R., 2010. Arsenic accumulation and biological responses of watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.) exposed to arsenite. *Environ. Exp. Bot.* 69, 167–174.
- Pandey, S., Rai, R., Rai, L.C., 2015. Biochemical and molecular basis of arsenic toxicity and tolerance in microbes and plants, in: *Handbook of Arsenic Toxicology*. Elsevier Inc., pp. 627–674.
- Peixoto, P.H.P., Cambraia, J., Sant'anna, R., Mosquim, P.R., Moreira, M.A., 1999. Aluminium effects on lipid peroxidation and on activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 11, 137–143.
- Piršelová, B., Boleček, P., Gálusová, T., 2016. Effect of cadmium and arsenic on chlorophyll fluorescence of selected soybean cultivars. *Russ. J. Plant Physiol.* 63, 469–473.
- R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Rahman, M.F., Ghosal, A., Alam, M.F., Kabir, A.H., 2017. Remediation of cadmium toxicity in field peas (*Pisum sativum* L.) through exogenous silicon. *Ecotoxicol.*

- Environ. Saf. 135, 165–172.
- Sa, B., Ali, S., Ma, F., Iqbal, N., Abbas, F., Msa, A., 2013. Alleviation of lead toxicity by silicon is related to elevated photosynthesis, antioxidant enzymes suppressed lead uptake and oxidative stress in cotton. *J. Biorem Biodegrad.* 4, 1–11.
- Sanglard, L.M.V.P., Martins, S.C. V, Detmann, K.C., Silva, P.E.M., Alyne, O., 2014. Silicon nutrition alleviates the negative impacts of arsenic on the photosynthetic apparatus of rice leaves: an analysis of the key limitations of photosynthesis. *Physiol. Plant.* 1, 1–12.
- Sanglard, L.M.V.P., Detmann, K.C., Martins, S.C. V, Teixeira, R.A., Pereira, L.F., Sanglard, M.L., Fernie, A.R., Araujo, W.L., DaMatta, F.M., 2016. The role of silicon in metabolic acclimation of rice plants challenged with arsenic. *Environ. Exp. Bot.* 123, 22–36.
- Schneider, J., Labory, C.R.G., Rangel, W.M., Alves, E., Guilherme, L.R.G., 2012. Anatomy and ultrastructure alterations of *Leucaena leucocephala* (Lam.) inoculated with mycorrhizal fungi in response to arsenic-contaminated soil. *J. Hazard. Mater.* 262, 1245–1258.
- Schoelynck, J., Bal, K., Backx, H., Okruzko, T., Meire, P., Struyf, E., 2010. Silica uptake in aquatic and wetland macrophytes: A strategic choice between silica, lignin and cellulose? *New Phytol.* 186, 385–391.
- Schoelynck, J., Struyf, E., 2016. Silicon in aquatic vegetation. *Funct. Ecol.* 30, 1323–1330.
- Sedlak, J., Lindasay, R.H., 1968. Estimation of total, protein bound, and nonprotein sulphhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* 25, 192–205.
- Shi, G., Cai, Q., Liu, C., Wu, L., 2010. Silicon alleviates cadmium toxicity in peanut plants in relation to cadmium distribution and stimulation of antioxidative enzymes. *Plant Growth Regul.* 61, 45–52.
- Shi, Q., Bao, Z., Zhu, Z., He, Y., Qian, Q., Yu, J., 2005. Silicon-mediated alleviation of Mn toxicity in *Cucumis sativus* in relation to activities of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase. *Phytochemistry* 66, 1551–1559.
- Shi, X., Zhang, C., Wang, H., Zhang, F., 2005. Effect of Si on the distribution of Cd in rice seedlings. *Plant Soil* 272, 53–54.
- Singh, S., Parihar, P., Singh, R., Singh, V.P., Prasad, S.M., Antonio, C., 2016. Heavy metal tolerance in plants: role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics. *Front. Plant Sci.* 6, 1–36.
- Song, A., Li, P., Fan, F., Li, Z., Liang, Y., 2014. The effect of silicon on photosynthesis and expression of its relevant genes in rice (*Oryza sativa* L.) under high-zinc stress. *PLoS One* 9, 1–21.
- Stoeva, N., Bineva, T., 2003. Oxidative changes and photosynthesis in oat plants grown in as-contaminated soil. *Bulg. J. Plant Physiol.* 29, 87–95.
- Sytar, O., Kumar, A., Latowski, D., Kuczynska, P., Strzalka, K., 2013. Heavy metal-induced oxidative damage, defense reactions, and detoxification mechanisms in plants. *Acta Physiol. Plant.* 35, 985–999.

- Tripathi, D.K., Singh, S., Pratap, V., Mohan, S., Kishore, N., Kumar, D., 2017. Silicon nanoparticles more effectively alleviated UV-B stress than silicon in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* 110, 70–81.
- Tripathi, D.K., Singh, S., Singh, V.P., Prasad, S.M., 2016. Silicon nanoparticles more efficiently alleviate arsenate toxicity than silicon in maize cultivar and hybrid differing in arsenate tolerance. *Front. Environ. Sci.* 4, 1–14.
- Tripathi, P., Tripathi, R.D., Singh, R.P., Dwivedi, S., Goutam, D., Shri, M., Trivedi, P.K., Chakrabarty, D., 2013. Silicon mediates arsenic tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) through lowering of arsenic uptake and improved antioxidant defence system. *Ecol. Eng.* 52, 96–103.
- Verma, S., Verma, P.K., Meher, A.K., Dwivedi, S., Bansiwala, A.K., Pande, V., Srivastava, P.K., Verma, P.C., Tripathi, R.D., Chakrabarty, D., 2016. A novel arsenic methyltransferase gene of *Westerdykella aurantiaca* isolated from arsenic contaminated soil: phylogenetic, physiological, and biochemical studies and its role in arsenic bioremediation. *Metallomics* 8, 344–353.
- Wang, S., Wang, F., Gao, S., 2014. Foliar application with nano-silicon alleviates Cd toxicity in rice seedlings. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 2837–2845.
- Wang, Y., Chai, L., Yang, Z., Mubarak, H., 2016. Chlorophyll fluorescence in leaves of *Ficus tikoua* under arsenic stress. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 97, 576–581.
- Wei-min, D.A.I., Ke-qin, Z.H., Bin-wu, D.U.A.N., Cheng-xiao, S.U.N., Kang-le, Z.H., Run, C.A.I., 2005. Rapid determination of silicon content in rice. *Rice Sci.* 12, 145–147.
- Wellburn, A.R., 1994. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.* 144, 307–313.
- Wu, J.W., Shi, Y., Zhu, Y.X., Wang, Y.C., Gong, H.J., 2013. Mechanisms of enhanced heavy metal tolerance in plants by silicon: a review. *Pedosphere* 23, 815–825.
- Wu, Z., Liu, S., Zhao, J., Wang, F., Du, Y., 2017. Comparative responses to silicon and selenium in relation to antioxidant enzyme system and the glutathione-ascorbate cycle in flowering Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *utilis*) under cadmium stress. *Environ. Exp. Bot.* 133, 1–11.
- Yadav, G., Srivastava, P.K., Parihar, P., Tiwari, S., Prasad, S.M., 2016. Oxygen toxicity and antioxidative responses in arsenic stressed *Helianthus annuus* L. seedlings against UV-B. *Photochem. Photobiol.* 165, 58–70.
- Ye, J., Yan, C., Liu, J., Lu, H., Liu, T., Song, Z., 2012. Effects of silicon on the distribution of cadmium compartmentation in root tips of *Kandelia obovata* (S., L.) Yong. *Environ. Pollut.* 162, 369–373.