

DALTON DIAS DA SILVA JUNIOR

EFEITOS DO SELÊNIO NO CRESCIMENTO E NO METABOLISMO EM
Arabidopsis thaliana

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2014

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

T

S586e
2014
Silva Junior, Dalton Dias da, 19-
Efeitos do selênio no crescimento e no metabolismo em
Arabidopsis thaliana / Dalton Dias da Silva Junior. - Viçosa,
MG, 2014.
vii, 37f. : il. ; 29 cm.

Orientador : Dimas Mendes Ribeiro.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.
Referências bibliográficas: f.30-37.

1. Planta - Crescimento. 2. *Arabidopsis thaliana*.
3. Selênio. 4. Amido. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Vegetal. Programa de
Pós-graduação Fisiologia Vegetal. II. Título.

CDD 22. ed. 581.4

DALTON DIAS DA SILVA JUNIOR

EFEITOS DO SELÊNIO NO CRESCIMENTO E NO METABOLISMO EM
Arabidopsis thaliana

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

APROVADA: 28 de Novembro de 2014.

Wagner Luiz Araújo
Coorientador

Kelly da Silva Coutinho Detmann

Dimas Mendes Ribeiro
Orientador

Dedico esta dissertação aos meus pais, irmãos e amigos que sempre acreditaram e me apoiaram a alcançar os meus objetivos.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”
(Martin Luther King).

AGRADECIMENTOS

À Deus e a Nossa Senhora de Nazaré por me proporcionarem a vida e a perseverança de enfrentar novos desafios todos os dias.

Aos meus pais Dalton Dias e Maria Margarida Dias por sempre acreditarem nos meus sonhos, pela força e segurança passada nessa etapa turbulenta da minha vida.

Aos meus irmãos Alexsandra Silva, Fábio Silva e Natasha Costa por todo o carinho e motivação ao longo desses anos de estudos, amo vocês.

À Simone Costa por todo carinho, motivação e ajuda para seguir em frente de cabeça erguida para vencer os desafios, muito obrigado.

Aos professores Dimas Ribeiro e Wagner Araújo por toda dedicação, orientação, motivação e amizade para a realização dessa dissertação.

Ao professor Adriano Nunes-Nesi, por aceitar a coorientação e por sugestões sempre pertinentes para o desenvolvimento da dissertação, muito obrigado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Vegetal por todo o apoio durante o período de mestrado.

Ao professor Fábio Murilo DaMatta por todo apoio concedido na utilização da estrutura do Laboratório de Nutrição e Metabolismo de Plantas.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo durante o mestrado.

À Dr^a Kelly Detmann pela participação na banca de avaliação, pelos comentários e sugestões.

Aos amigos e colegas da pós-graduação por todo o carinho e companheirismo durante as disciplinas e eventuais ajudas na condução de experimentos.

Aos meus amigos que conheci durante o período em Viçosa, principalmente à Vivyanne Nayse por todo o carinho, exemplo de fé e perseverança que devemos possuir para alcançar um sonho; Danielle Brito pela amizade, ensinamentos e demonstração de persistência no trabalho árduo que é a pesquisa; ao Roberto Neri (bebeco) pelo companheirismo e amizade; à Auxiliadora Martins (Maria Auxiliadora) por sua amizade e por ser referência de comprometimento e dedicação na pesquisa, muito obrigado.

Aos colegas e amigos de trabalho do laboratório (UCP): Renan Paulo, Vitor Laia, João H, Mariana (Maroca), Alberto(Albert) e Franklin Magno, muito obrigado.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Nutrição e Metabolismo Vegetal por todos os esclarecimentos e companheirismo, Ana Carla, Carla Quinhones, Kelly Coutinho, Lílian Sanglard e Leandro Ibiá.

Aos estudantes de iniciação científica, Kallyne Ambrósio e Ítalo Lima, pela ajuda e companheirismo.

Ao estudante de iniciação científica Welder Alves por ser interessado e completamente ativo para desenvolver qualquer orientação no laboratório, muito obrigado pela ajuda.

Ao Prof. Hugo Pinheiro (UFRA), por ter me orientado durante a iniciação científica, a qual devo ensinamentos fundamentais, meu muito obrigado.

À Dr^a Fabrícia Kelly (UFRA) por todos os ensinamentos, compreensão e amizade durante o período de iniciação científica, muito obrigado.

Aos amigos e verdadeiros irmãos do curso de Agronomia: Alan Nahon, Alexandre Vilar, Tiago Magno, Rafael Ohashi, Nayara Feitosa, Ediane Alves, Ingrid Luz e Gledson Castro por tudo que vivemos juntos e por aguentarem o meu jeito búfalo de ser, muito obrigado.

À minha amiga Thaís Soares Pires, por todos os momentos especiais vividos na cidade de Viçosa, obrigado.

Ao meu amigo Lucas Morais (gordo), pela amizade e companheirismo, obrigado.

Aos meus amigos do conjunto Geraldo Palmeira, por toda motivação e ajuda durante etapas difíceis na minha vida, em especial Nelma Ribeiro, Selma Ribeiro, Felipe Coutinho, Karina Coutinho, Jorge Lameira e Atos Felipe, muito obrigado.

Ao meu grande amigo e irmão Janio Correa por toda ajuda e motivação para a conclusão do mestrado.

ÍNDICE

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. MATERIAL E MÉTODOS	3
3.1. Material vegetal e condições gerais	4
3.2. Efeito do Se na germinação das sementes e no crescimento da radícula	4
3.3. Teor relativo de água (TRA) e taxa de crescimento relativo (TCR)	5
3.4. Quantificação da fluorescência	5
3.5. Quantificação de metabólitos	6
3.6. Quantificação de NAD(P)H.....	7
3.7. Perfil metabólico	7
3.8. Extração e ensaios enzimáticos	8
3.9. Quantificação de macro e micronutrientes	8
3.10. Delineamento experimental	9
4. RESULTADOS	9
5. DISCUSSÃO	27
6. CONCLUSÕES	30
7. REFERÊNCIAS	30

RESUMO

SILVA JUNIOR, Dalton Dias da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2014. **Efeitos do selênio no crescimento e no metabolismo em *Arabidopsis thaliana*.** Orientador: Dimas Mendes Ribeiro. Coorientadores: Wagner Luiz Araújo e Adriano NunesNesi.

Apesar da conhecida associação entre o selênio (Se) e o metabolismo do carbono, as vias regulatórias que conectam o controle do crescimento com o metabolismo primário de plantas cultivadas com Se, não são, ainda conhecidas. Assim, este trabalho objetivou investigar a ação do Se no metabolismo primário em *Arabidopsis thaliana*. Para tanto, plantas de *Arabidopsis thaliana* foram cultivadas em solo suplementado com selenato de sódio, à concentração de 50 μM . O Se promoveu uma redução significativa no crescimento das plantas de *Arabidopsis*. Os níveis de glicose tanto na parte aérea quanto no sistema radicular foram reduzidos por solução de Se. Além disso, o Se promoveu incremento significativo nos níveis de nitrato tanto na parte aérea como na raiz quando comparado com as plantas controle. No entanto, os níveis de aminoácidos totais, sacarose e proteínas permaneceram estáveis nas plantas tratadas com Se, em comparação com as do plantas controle. O conteúdo de amido foi alterado em plantas tratadas com Se. A exposição das plantas à solução de Se levou a um aumento na atividade da AGPase durante o final do período noturno. Contrariamente ao metabolismo do amido, o Se não promoveu alterações significativas na atividade da redutase do nitrato. Com o intuito de se investigar mais detalhadamente o efeito do Se no metabolismo de carboidratos, plantas de *Arabidopsis Col-0* e dos mutantes *pgm* e *sex₁₋₄* foram tratadas com Se. Sob a ação do Se, a massa seca da parte aérea e da raiz bem como a taxa de crescimento relativo das plantas *Col-0* e *sex₁₋₄* foram reduzidas, independente do fotoperíodo utilizado. O tratamento com Se não reduziu a razão parte aérea: raiz das plantas *Col-0* e *sex₁₋₄*. Interessante, a massa seca da roseta, a massa seca da raiz, a razão parte aérea: raiz e a taxa de crescimento relativo das plantas do mutante *pgm* não foram afetadas pelo tratamento com Se, sob condição de dia curto ou de dia longo. Ademais, menores acúmulos de macro e micronutrientes foram acompanhados de uma redução no crescimento das plantas *sex₁₋₄* cultivadas com Se. Assim, um desbalanço entre o metabolismo mineral e o crescimento parece ocorrer nas plantas com redução na degradação de amido. Em conjunto, as informações obtidas oferecem uma melhor compreensão dos mecanismos fisiológicos e metabólicos associados ao Se em plantas.

ABSTRACT

SILVA JUNIOR, Dalton Dias da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2014. **Selenium effects on growth and metabolism in *Arabidopsis thaliana***. Advisor: Dimas Mendes Ribeiro. Co-advisors: Wagner Luiz Araújo and Adriano Nunes Nesi.

Despite the known association between selenium (Se) and the carbon metabolism, the regulatory pathways that connect growth regulation with primary metabolism in plants cultivated with Se are still unknown. Hence, this study aimed to investigate the action of Se on the primary metabolism. For this purpose, *Arabidopsis thaliana* plants were cultivated in soil supplemented with 50 μM sodium selenate. Se caused a significant reduction in growth of *Arabidopsis* plants. Glucose levels in both shoot and root were reduced by Se. In addition, Se promoted a significant increase in nitrate levels in both shoot and roots, when compared to the control plants. However, levels of total amino acids, sucrose and proteins remained constant in plants treated with Se, when compared to the control plants. Starch content was also altered in plants treated with Se. The exposure of plants to Se led to an increase in AGPase activity during the late night period. By contrast to starch metabolism, Se did not cause significant changes in nitrate reductase activity. In order to further investigate the effect of Se in carbohydrates metabolism, Col-0 *Arabidopsis* plants and *pgm* and *sex₁₋₄* mutants were treated with Se. In presence of Se, dry weight of shoot and root as well as the relative growth rate of Col-0 and *sex₁₋₄* plants were reduced, regardless of photoperiod used. The treatment with Se did not reduce the shoot-to-root ratio of Col-0 and *sex₁₋₄* plants. Interestingly, rosette and root dry weight, shoot-to-root ratio and relative growth rate of *pgm* plants were not affected by treatment with Se under both short- or long-day conditions. In addition, lower accumulation of macronutrients and micronutrients were accompanied by a growth reduction of *sex₁₋₄* plants cultivated with Se. Collectively, the results presented here show that an imbalance between mineral metabolism and growth seems to occur in plants with decreased starch breakdown in presence of Se. Altogether, the gathered information offers a better understanding of the physiological and metabolic mechanisms associated with Se in plants.

1.INTRODUÇÃO

O selênio (Se) é um micronutriente essencial para muitos organismos, incluindo bactérias, pássaros e mamíferos. Em animais, a essencialidade do Se, em quantidades traço, é bem estabelecida (Terry et al 2000). O Se contribui com quatro átomos para a formação da molécula da peroxidase da glutathione (Miller et al 1991). A enzima é amplamente distribuída, no reino animal, e protege as células contra danos peroxidativos, auxiliando, por exemplo, na prevenção do desenvolvimento de células cancerígenas nos seres humanos (Burk 2002, Zhang et al 2006). Por outro lado, embora o Se não seja um nutriente essencial as plantas, vários compostos selênicos são encontrados em grandes quantidades em algumas espécies e, oferece proteção contra a herbivoria por insetos e infecção por fungos (Quinn et al 2010, Hanson et al 2014). Saliente-se também que em altas concentrações, esse elemento pode ser tóxico ao metabolismo celular, pois dada à sua semelhança química com o enxofre (S), o Se substitui de forma não específica o S em proteínas sulfuradas (Stadtman 1990, Stadtman 1996). Os principais seleno-aminoácidos incorporados em proteínas são seleno-cisteína e seleno-metionina, em substituição à cisteína e à metionina, respectivamente. Neste contexto, a ligação entre dois átomos de selênio é aproximadamente um sétimo maior e um quinto mais fraca do que a ligação dissulfídrica. Assim, o Se pode interferir na formação de pontes dissulfídricas, resultando em uma leve, mas significativa alteração na estrutura terciária das S-proteínas, levando a efeitos negativos sobre sua atividade catalítica (Terry et al 2000).

O Se apresenta um ciclo biogeoquímico complexo que envolve desde a sua evaporação a partir dos mares atingindo, conseqüentemente, a superfície do solo e das plantas. No solo, o Se pode interagir com outros elementos químicos alterando a sua disponibilidade para as plantas. Por outro lado, uma vez depositado na superfície das plantas esse elemento pode ser metabolizado e incorporado ao metabolismo vegetal ou pode ser ainda volatilizado (Sors et al 2005). A disponibilidade do Se para as plantas é dependente de parâmetros geoquímicos, isto é, pH, condição redox e características do solo tais como carbono orgânico, argila e hidróxido de ferro. Em função desses parâmetros, o Se pode ser encontrado no ambiente em cinco estados de oxidação metaestáveis -II, -I, 0, +IV, e +VI (Winkel et al 2012). Assim, as principais formas inorgânicas do Se são: selênio elementar (Se^0), seleneto (Se^{-2}), tioselenato (HSeO_3^{-2}), selenato (SeO_4^{-2}) e selenito (SeO_3^{-2}).

As plantas diferem muito na sua habilidade em acumular Se em seus tecidos. Plantas capazes de acumular altas concentrações de Se, sem que ocorram danos ao

crescimento e ao metabolismo, são conhecidas como hiperacumuladoras e incluem espécies do gênero *Astragalus*, *Morinda*, *Neptunia*, *Oonopsis*, *Stanleya*, e *Xylorhiza* (White et al 2007). Tais plantas são encontradas em solos seleníferos da China e dos Estados Unidos podendo acumular mais de 1000 mg Se kg⁻¹ de massa seca (MS) nos tecidos (Salt et al 1995). Por outro lado, plantas de diversas famílias, tais como, *Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Chenopodiaceae*, *Fabaceae* e *Rubiaceae* possuem capacidade de acumular Se em concentrações de 25 mg kg⁻¹ MS, não exibindo mais que 100 mg Se kg⁻¹ MS, quando cultivadas em solos seleníferos. Por outro lado, espécies de plantas do gênero *Aster*, *Atriplex* e *Gutierrezia* possuem baixa capacidade de acúmulo em média 5 mg Se kg⁻¹ MS (Pilon-Smits e Quin 2010). A diferença na capacidade das plantas em acumular e tolerar o Se tem sido atribuída a diferentes mecanismos. Durante a síntese protéica, as células das plantas acumuladoras excluem o Se-aminoácidos de seus polipeptídios (Brown e Shrift 1981), por um processo que impede a síntese ou provoca uma modificação do Se-aminoácidos, bloqueando sua incorporação em proteínas (Eustice et al 1981, Valdez Barillas et al 2011). Esse mecanismo não pode ser usado pelas plantas não-acumuladoras, pois não possuem um sistema enzimático capaz de discriminar os aminoácidos que possuem Se (Neuhierl et al 1999, Pilon-Smits e LeDuc 2009). A acumulação do Se também pode ocorrer via compartimentalização dentro do vacúolo (Neuhierl and Bock 1996), como selenato, ou na forma de Se-aminoácidos não-protéico (Terry et al 2000). Ademais, em plantas hiperacumuladoras o processo de volatilização do Se parece ser outro mecanismo responsável por eliminar o excesso de selenocompostos (Freeman et al 2006).

O Se pode também promover alterações no crescimento e desenvolvimento vegetal por interferir nos processos de assimilação do carbono e do nitrogênio (Ghosh et al 2013). Neste contexto, verificou-se um aumento no crescimento do sistema radicular e da parte aérea em plantas de *Arabidopsis thaliana* tratadas com Se em baixa concentração (Lehotai et al 2012). Ademais, o Se parece promover incremento no crescimento vegetal via maior acúmulo de amido nos cloroplastos (Pennanen et al 2002). Não obstante, incrementos no conteúdo de carboidratos foram observados em plantas de batata (*Solanum tuberosum*) cultivada com Se, resultando em aumentos de 20% e 50% da concentração de açúcares solúveis nas folhas e nos tubérculos, respectivamente (Turakainen et al 2006). Reduções drásticas no teor relativo de água em *Hordeum vulgare* foram observadas em condições de deficiência hídrica. Entretanto, plantas submetidas à limitação hídrica e tratadas com Se apresentaram significativo aumento no teor relativo de água e na massa seca quando comparadas às plantas controle (Habibi 2013). O Se parece ser

também capaz de regular o status hídrico da planta em condições de seca ao possibilitar que o sistema radicular regule a absorção de água (Kuznetsov et al 2003).

O Se também modula positivamente a atividade das enzimas, dismutase do superóxido, peroxidase do ascorbato e catalase, envolvidas no mecanismo de tolerância das plantas aos danos oxidativos induzido tanto por estresse abiótico quanto por estresse biótico (Hasanuzzaman e Fujita 2011). Neste contexto, o Se reverteu parcialmente os danos foto-oxidativos em folhas de plantas de batatas tratadas com paraquat via modulação enzimática da atividade da dismutase do superóxido (Seppänen et al 2003). Em adição, o Se inibiu os efeitos deletérios em plantas expostas a metais pesados como arsênio, cádmio e o mercúrio (Garcia-Barrera et al 2012). De forma interessante, o mecanismo não enzimático sofre regulação semelhante, uma vez que o Se parece atuar como um cofator na rota de biossíntese da glutatona redutase (Djanaguiraman et al 2010), potencializando, assim, o mecanismo de extinção de espécies reativas de oxigênio. Uma análise dos resultados acima leva a uma visão de como o Se poderia estar controlando o metabolismo e, conseqüentemente, o crescimento das plantas em resposta a situações de estresse. Ademais, apesar da conhecida associação entre o Se e o metabolismo do carbono, as vias regulatórias que conectam o controle do crescimento com o metabolismo primário de plantas cultivadas com Se, não são, ainda conhecidas. Assim, estudos metabólicos mais aprofundados tornam-se necessários para uma melhor compreensão dos efeitos do Se sobre o metabolismo das plantas.

2. OBJETIVOS

Este trabalho objetivou analisar o efeito do Se no metabolismo primário de plantas de *Arabidopsis thaliana* crescendo em solo suplementado com selenato de sódio pelo acompanhamento dos níveis de metabólitos e, do crescimento das plantas. Além disso, investigou-se o efeito do Se na atividade da redutase do nitrato, da rubisco e outras enzimas do ciclo de Calvin é resultado, ou é fortemente modulado por mudanças simultâneas nos níveis de Se nas plantas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal e condições gerais

Sementes de *Arabidopsis thaliana* ecótipo Columbia (Col-0) e do mutante *pgm* (Tabela 1), caracterizada por uma reduzida expressão na enzima fosfoglicomutase, responsável por direcionar o metabolismo celular para a síntese do amido, bem como, sementes do mutante *sex₁₋₄* (Tabela 1), relacionadas com o processo de degradação do amido, foram semeadas em substrato comercial (Tropstrato HT[®]) em vasos plásticos com 0,2 L de capacidade. As bandejas contendo os vasos foram mantidas em câmaras de crescimento noite/dia (tipo BOD), sob fotoperíodo de 8/16 h ou 16/8 h(dia/noite), temperatura 22/16 °C (dia/noite), umidade relativa 65 ± 5 % e intensidade de luz de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Duas semanas após a semeadura das sementes procedeu-se o desbaste das plântulas deixando-se apenas uma plântula por vaso. Em seguida, água (controle) ou solução de selenato de sódio (Na_2SeO_4 , Sigma Aldrich), à concentração de 50 μM , foi distribuída na superfície do solo, com o auxílio de uma pipeta.

As plantas foram colhidas 28 dias após a semeadura das sementes. O número de folhas, área foliar, massa fresca e seca das plantas foram determinadas. As rosetas bem como as raízes das plantas também foram coletadas para análise de metabólitos. As amostras foram embaladas em papel alumínio, imediatamente mergulhadas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer, -80 °C, até análise.

Tabela 1 Descrição dos mutantes utilizados

Genótipos	Localização	WT	Metabolismo	Referência
<i>pgm</i>	Cloroplasto	Col-0	Incapaz de sintetizar amido	Periappuramet al (2000)
<i>sex₁₋₄</i>	Cloroplasto	Col-0	Incapacidade de degradar amido	Ritte et al (2006)

3.2. Efeito do Se na germinação das sementes e no crescimento da radícula

As sementes foram esterilizadas inicialmente em etanol 70 %, por 2 min, sendo posteriormente transferidas para solução de hipoclorito de sódio 2,5 %, por 15 min e, em seguida, lavadas repetidamente, por pelo menos seis vezes, em água estéril. Após a esterilização, as sementes foram distribuídas em placas de Petri previamente autoclavadas, contendo meio de cultivo ½ MS (Murashige e Skoog 1962), com diferentes concentrações

(0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 e 50 μM) de selenato de sódio e suplementado com 1% de sacarose (p/v). Em seguida, as placas de Petri foram acondicionadas a temperatura de 4°C, por três dias no escuro. Decorrido esse tempo, as placas foram mantidas em sala de crescimento por 21 dias. Ao final do experimento, o número de sementes germinadas e o crescimento da radícula foram registrados.

3.3. Teor relativo de água (TRA) e taxa de crescimento relativo (TCR)

O TRA foi determinado utilizando-se de folhas inteiras, as quais foram destacadas e imediatamente pesadas para obtenção da massa fresca (MF). Em seguida, as mesmas foram acondicionadas em placas de Petri, com papel filtro contendo 10 mL de água desionizada, por um período de 4 h. Após esse período, as folhas foram novamente pesadas para obtenção da massa túrgida (MT) e posteriormente secas em estufa de circulação forçada a 65 °C, até atingirem massa constante; obtendo-se, assim, a massa seca (MS). De acordo com Barrs e Weatherley(1962) o TRA foi calculadoconforme a fórmula:

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

A TCR foi determinada com base na MS, conformeBoyeset al(2001). Para tanto, a massa seca inicial (MS_1) foi determinada14 dias (T_1) após a semeadura das sementes e a massa seca final das plantas (MS_2) foi quantificada 28 dias (T_2) após a semeadura das sementes. A TCR foi calculada conforme a fórmula(Hunt et al 2002):

$$\text{TCR (mg g}^{-1} \text{ d}^{-1}) = \frac{\ln(\text{MS}_2) - \ln(\text{MS}_1)}{T_2 - T_1}$$

Em que: MS_1 , massa seca inicial; MS_2 , massa seca final; T_1 , tempo inicial; T_2 , tempo final

3.4. Quantificação da fluorescência

Os parâmetros da fluorescência da clorofila a foram analisados com o auxílio de um fluorômetro de imagem (IMAGING PAM Walz). Para F_v/F_m , uma irradiância de 0,5 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ foi aplicada para determinar F_0 . Para obter a fluorescência máxima

(F_m) um pulso saturante de $8500 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ por 0,8 s foi aplicado. A raz\u00e3o F_v/F_m foi calculada como $(F_m - F_0) / F_m$ (Oh et al 1996).

3.5. Quantifica\u00e7\u00e3o de metab\u00f3litos

Para investigar-se como o Se coordena o metabolismo prim\u00e1rio, os n\u00edveis de glicose, sacarose, a\u00e7ucares fosfatados, amino\u00e1cidos, amido, nitrato, clorofilas e prote\u00ednas, foram determinados em plantas tratadas com Se. Os metab\u00f3litos foram extra\u00eddos em etanol 80 %, seguido por uma nova extra\u00e7\u00e3o em etanol 50 %, como descrito por Geigenberger et al (1996). Glicose e sacarose foram determinadas usando-se um ensaio de substrato enzim\u00e1tico cont\u00ednuo, como descrito por Cross et al (2006). Para a determina\u00e7\u00e3o de amido, o precipitado da extra\u00e7\u00e3o etan\u00f3lica foi solubilizado por aquecimento a $95 \text{ }^\circ\text{C}$, em $250 \mu\text{L NaOH}$ (0,1 M). Em seguida, $70 \mu\text{L}$ de solu\u00e7\u00e3o de \u00e1cido ac\u00e9tico (1 M) foram adicionados \u00e0s amostras, e o conte\u00fado de amido foi determinado como equivalentes de glicose (Hendriks et al 2003).

A quantifica\u00e7\u00e3o de nitrato foi feita como descrito por Mori (2000). A rea\u00e7\u00e3o enzim\u00e1tica foi iniciada pela adi\u00e7\u00e3o de uma al\u00edquota de $5 \mu\text{L}$ do extrato etan\u00f3lico em um volume de rea\u00e7\u00e3o de $150 \mu\text{L}$, constitu\u00eddo de tamp\u00e3o fosfato de pot\u00e1ssio, 0,1 mM (pH 7,5), NADPH 0,25 mM e nitrato redutase 0,005 U. Depois de 30 min de incubac\u00e3o \u00e0 temperatura ambiente, $20 \mu\text{L}$ de fenazinametanosulfato (5 mM) foram adicionados \u00e0 rea\u00e7\u00e3o e as microplacas (Nunc GmbH e Co. KG) foram incubadas, por 10 min no escuro. Em seguida, adicionou-se \u00e0 rea\u00e7\u00e3o $30 \mu\text{L}$ de sulfamil\u00e2mida 2 % (m/v) dissolvida em H_3PO_4 (2 mM) e $30 \mu\text{L}$ de N-(1-naftil)-etilenodiaminodihidroclor\u00eddo 0,04 % (m/v); o nitrato foi quantificado em leitor de ELISA (Molecular Devices, Sunny Valle, EUA), a 570 nm.

O conte\u00fado de amino\u00e1cidos totais foi quantificado de acordo com Gibonet et al (2004). Em uma microplaca adicionou-se $25 \mu\text{L}$ do extrato etan\u00f3lico, $25 \mu\text{L}$ de etanol 70 %, $50 \mu\text{L}$ de tamp\u00e3o citrato pH 5,2 acrescidos de \u00e1cido asc\u00f3rbico 0,2 % (p/v) e $100 \mu\text{L}$ de ninhidrina 1% (p/v) em metanol 70% (v/v), em cada po\u00e7o. A microplaca foi incubada no escuro por 20 min a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ e centrifugada por 15 seg a 12800 g. Posteriormente, foi feita a leitura da placa no comprimento de onda de 570 nm. Para a determina\u00e7\u00e3o de amino\u00e1cidos totais fez-se a curva de calibra\u00e7\u00e3o utilizando leucina como padr\u00e3o, \u00e0s concentra\u00e7\u00f5es de 0, 0,04, 0,06, 0,20, 0,40 e 1,00 mM.

Utilizou-se a t\u00e9cnica de Bradford (1976) com algumas modifica\u00e7\u00f5es (Ramagli e Rodriguez 2014), para determina\u00e7\u00e3o dos teores de prote\u00ednas nos extratos. Uma s\u00e9rie de

solução de albumina soro bovina (BSA) diluída com o mesmo tampão de extração serviu como padrão para quantificação das proteínas. A quantificação das proteínas foi conduzida em microplacas, em leitor de ELISA(Molecular Devices, Sunny Valle, EUA), a 570 nm.

As clorofilas foram determinadas como descrito por Arnon (1949). Utilizou-se 50 μL do extrato vegetal acrescido de 120 μL de etanol (98 %). Ademais, a concentração de hexoses fosfatados glicose 6 fosfato, frutose 6 fosfato e glicose 1 fosfato foram estimados conforme a metodologia descrita por Gibon(2002).

3.6.Quantificação de NAD(P)H

Os conteúdos de NAD(H) e NADP(H) foram determinados como descrito anteriormente por Schippers et al (2008). Para tanto, aproximadamente 50mg de massa fresca da roseta e da raiz das plantas de Arabidopsis foram utilizadas. As formas reduzidas e oxidadas foram distinguidas pela destruição preferencial em ácido ou base, respectivamente. Em um leitor ELISA(Molecular Devices, Sunny Valle, EUA) foram obtidas as absorvâncias a 570 nm. A equação utilizada para determinação da concentração dos nucleotídeos foi obtida por regressão a partir da curva padrão e posterior normalização para a massa fresca.

3.7.Perfil metabólico

Para determinação de metabolitos foram utilizados os procedimentos descritos por Lisec et al(2006). Aproximadamente 50 mg de massa fresca foram colocadas em tubos de 1,5 mL de capacidade e extraída em uma mistura refrigerada de água, metanol e clorofórmio (1:2,5:1, v/v/v) e 60 μL de ribitol (0,2 mg/mL). As amostras foram agitadas vigorosamente em vórtex por 10 s e posteriormente incubadas a 4°C sob agitação (1246 g), por 1 h. Decorrido esse tempo, as amostras foram centrifugadas a 16200g, por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, adicionando-se 750 μL de água ultrapura. Posteriormente, as amostras foram agitadas em vórtex durante 10 s seguindo-se a uma nova centrifugação a 16200 g, por 15 min, a 4°C. A camada superior (fase polar) foi recolhida em alíquotas de 200 μL e adicionada em um novo tubo. Posteriormente as amostras foram secas a vácuo e armazenadas em freezer, -80°C. Para a derivatização, adicionou-se 40 μL do reagente de metoxiamação a cada amostra procedendo-se agitação a 16200 g por 2 h, a 37°C. Em seguida foi adicionado 70 μL de N-Methyl-N-

(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA) e padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) às amostras, procedendo-se à agitação 1246 g, por 30 min, a 37°C. As amostras foram transferidas para frascos de vidro e analisadas por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa (GCMS).

Os cromatogramas e os espectros de massa gerados foram analisados utilizando o software TAGFINDER (Luedemann et al 2008), e a identificação e anotação dos dados apresentados conformes recomendações de Fernie et al (2011).

3.8. Extração e ensaios enzimáticos

As amostras de folhas foram trituradas em nitrogênio líquido e estocadas em freezer a -80 °C, até análise. Quatro amostras (para cada tratamento) de aproximadamente 50 mg de peso fresco foram extraídas em 1 mL de tampão de extração. A composição do tampão de extração foi: HEPES/KOH 50 mM pH 7,5, glicerol 20 % (v/v), albumina de soro bovino 0,25 % (m/v), Triton-X 100 1 % (v/v), MgCl₂ 10 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, benzamidina 1 mM, feniletilsulfanilfluorido 1 mM e DTT 0,5 mM. A atividade total (25 min de incubação, a 25 °C) e a atividade inicial da Rubisco foram determinadas como descrito por Sulpice et al (2007). A atividade da sintase da sacarose (SuSy) foram estimadas de acordo com Praxedes et al (2006). A atividade da fosfofrutoquinase (PFK) foi determinada segundo Jenner et al (2001). A atividade da enolase foi determinada como descrito por Forsthoefel et al (1995). A atividade da aldolase foi determinada conforme descrito por Haake et al (1998). A atividade do glicerol aldeído 3 fosfato desidrogenase (GAPDH) foi determinada segundo Munoz-Bertomeu et al (2009). A atividade da triose fosfato isomerase (TPI) foi determinada conforme Ito et al (2003). A atividade da fosfoglicomutase (PGM) e fosfoglicoisomerase (PGI) determinada conforme Linet et al (1988).

3.9. Quantificação de macro e micronutrientes

Para a determinação de elementos minerais utilizou-se cerca de, 30 mg do tecido vegetal os quais foram mineralizados em 4 mL de ácido nítrico/ perclórico (HNO₃: HClO₄, 4:1 v/v) a 170°C. Adicionou-se posteriormente ácido clorídrico (HCl) 5 M e água desionizada (ultrapura) aquecendo essa reação a 80°C, por 30 minutos. Para formação de hidretos (redução) foi utilizada solução de boridreto de sódio (NaBH₄) e hidróxido de sódio (NaOH) diluído em água ultrapura. A quantificação dos nutrientes foi realizada em

espectrômetro de absorção atômica com plasma indutivamente acoplado (Perkin Elmer Optima 7300 DV). O ponto zero da curva de calibração foi preparado com todos os reagentes e com os mesmos procedimentos utilizados para a mineralização das amostras. O aparelho foi programado para realizar nova leitura da curva padrão (de acordo com a determinação de cada nutriente) para diminuir erros de calibração do mesmo (Smrkolj and Stibilj 2004).

3.10. Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado nos experimentos foi o inteiramente casualizado. A unidade experimental dos experimentos de análise de metabólitos e atividade enzimática foi composta por 50 mg de material vegetal, por reação, com seis e quatro repetições, respectivamente, por tratamento. Para os experimentos sobre crescimento das plantas, a unidade experimental foi composta por dez repetições, constituída de duas plantas cada. Os experimentos de determinação de macro e micronutrientes tiveram a unidade experimental composta de 30 mg de material vegetal, por reação, com seis repetições por tratamento. As diferenças entre as médias foram examinadas pelo teste t. Todos os dados foram analisados usando-se SPSS (Statistical Package for the Social Science) 11.0 para Windows Statistical Software Package (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

4. RESULTADOS

O Sereduziu a germinação das sementes e o crescimento radicular dasplântulas de Arabidopsis de maneira dependente da dose (Fig. 1A, B). O efeito máximo na inibição da germinação das sementes e no crescimento da radícula foi induzido por solução de Se, à concentração de 50 μ M, sendo a germinação reduzida em 99 % enquanto o mesmo tratamento promoveu uma redução no comprimento da radícula de 50 %, após 21 dias de exposição à solução de Se.

O Se, à concentração de 50 μ M, também promoveu uma redução significativa no crescimento da roseta das plantas de Arabidopsis (Fig. 2A). Quando as plantas de Arabidopsis foram crescidas em solo suplementado com selenato de sódio, a massa seca da

raiz e a massa seca da roseta foram 2 vezes menor em relação aos respectivos controles (Fig. 2B, C). Como consequência, ocorreu uma redução significativa no acúmulo da massa

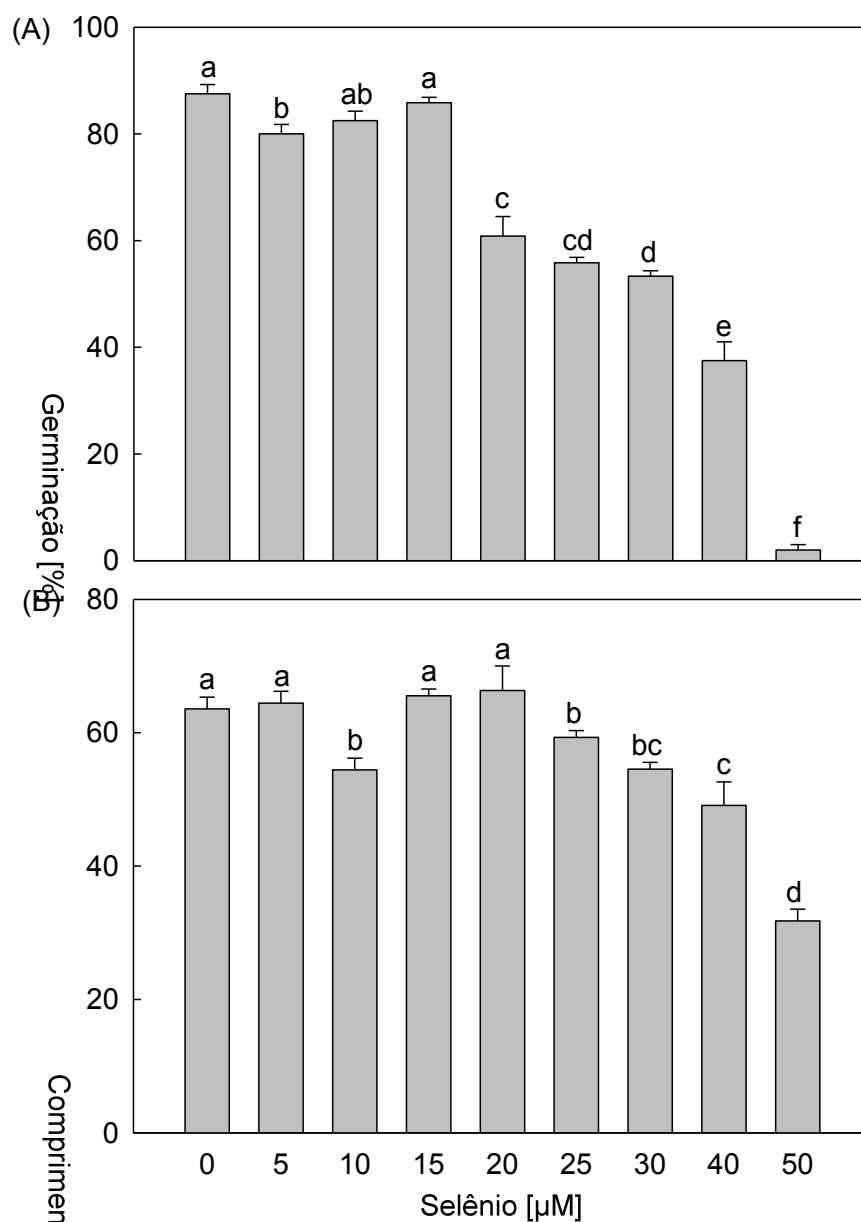


Figura 1. Efeito do Se na germinação de sementes (A) e no comprimento da radícula (B) de plântulas de *Arabidopsis*. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, em nível de 5 % pelo teste Tukey. Médias de 6 repetições \pm erro da média.

seca total das plantas, embora o Se não tenha comprometido a razão parta aérea: raiz em comparação com as plantas do controle (Fig. 2D, E). Por seu turno, o Se também reduziu significativamente a área da roseta e a taxa de crescimento relativo das plantas de *Arabidopsis* (Fig. 2F, G). Apesar da redução na biomassa da roseta das plantas de *Arabidopsis* tratadas com Se, não houve diminuição do número de folhas da roseta e na

área foliar específica (AFE) da roseta (Fig. 2H, I). Ademais, o teor relativo de água da roseta das plantas tratadas com Se não diferiu significativamente das plantas do controle (Fig. 2J).

O crescimento e o desenvolvimento das plantas é conhecido por ser altamente dependente da disponibilidade de carbono (Wiese et al 2007, Pantin et al 2011). Assim, o efeito do Se no metabolismo primário de plantas de *Arabidopsis* crescendo em solo

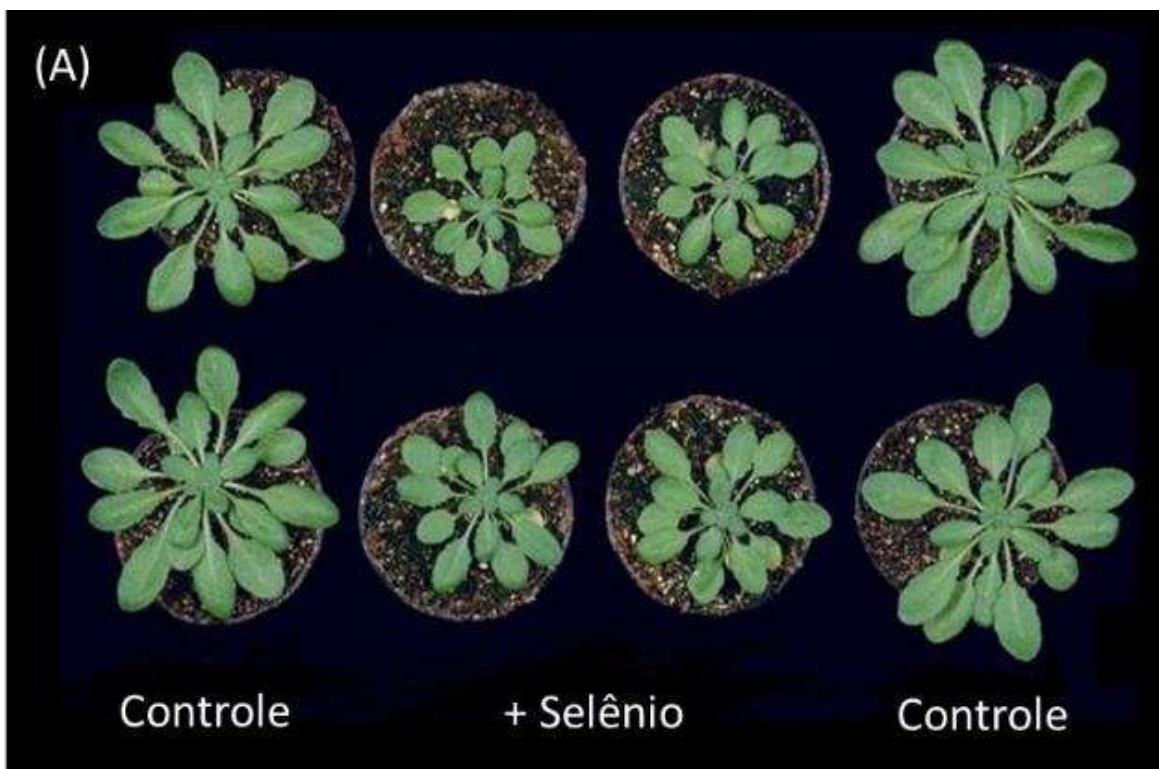


Figura 2. (Ver continuação na página seguinte)

suplementado com selenato de sódio foi investigado acompanhando-se os níveis de metabólitos envolvidos no metabolismo central das plantas. A biomassa da parte aérea e do sistema radicular foi significativamente reduzida pelo Se (Fig. 3A). Os níveis de glicose tanto na parte aérea quanto no sistema radicular foram reduzidos por solução de Se (Fig. 3B). Ademais, o Se promoveu incremento significativo nos níveis de nitrato tanto na parte aérea como na raiz quando comparado com as plantas do controle (Fig. 3C). No entanto, os níveis de aminoácidos totais, sacarose e proteínas permaneceram estáveis nas plantas tratadas com Se, em comparação com as plantas do controle (Fig. 3D-F). O Se não promoveu alterações significativas nos níveis de NAD, NADH, NADP e NADPH (Fig.

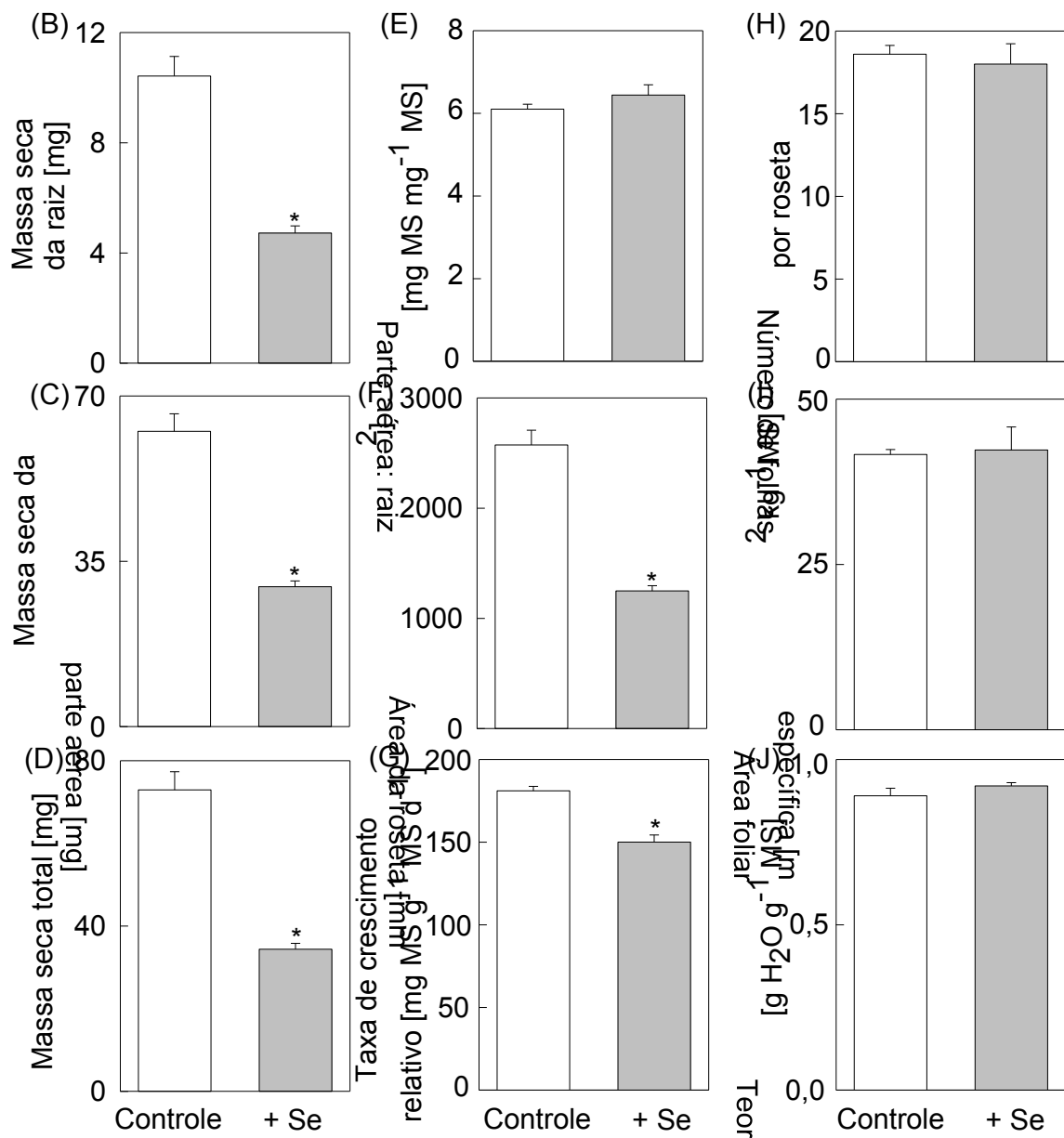


Figura 2. Alterações fenotípicas das plantas de *Arabidopsis* promovidas pelo tratamento com selenato de sódio, à concentração de 50 μM (A). Análise de crescimento das plantas de *Arabidopsis* tratadas com Se (B-J). Médias de 10 repetições \pm erro da média.

4A-D). Neste contexto, não foram observadas alterações nas razões entre as formas reduzidas e oxidadas. Ademais, o Se, também, não afetou de forma significativa a quantidade de clorofila total e a eficiência fotoquímica do fotossistema II avaliada pela razão F_v/F_m (Fig. 4E, F). O conteúdo de amido foi alterado em plantas tratadas com Se (Fig. 5A), sendo este visualizado pelo desbalanço entre a síntese (durante o período do dia)

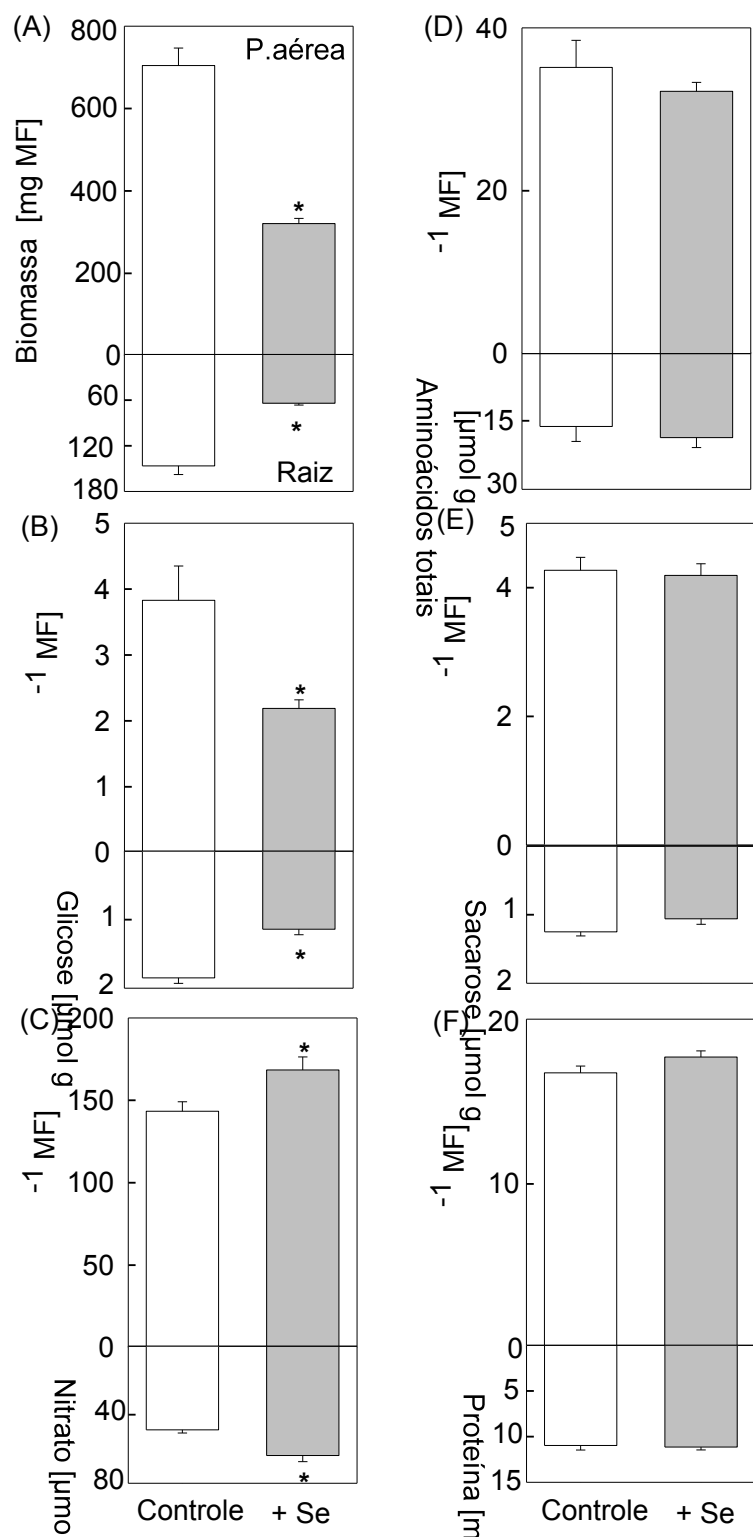
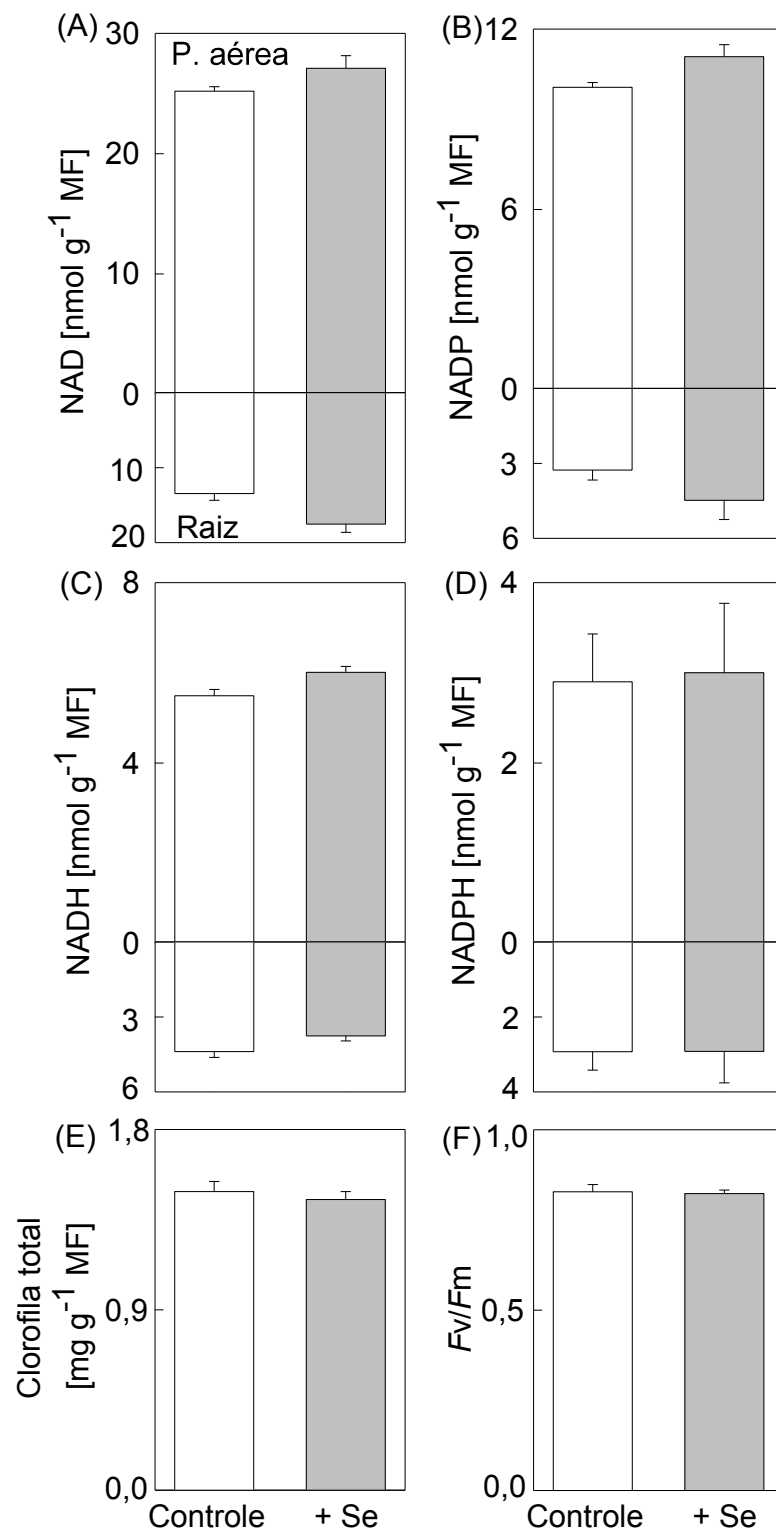


Figura 3. Biomassa (A), glicose (B), nitrato (C), aminoácidos totais (D), sacarose (E) e proteínas (F) na parte aérea e no sistema radicular das plantas de *Arabidopsis thaliana* tratadas com selenato de sódio, à concentração de 50 μM . O asterisco indica que houve diferença significativa em nível de 5% pelo teste t entre as plantas tratadas com Se e as plantas do controle. Médias de 6 repetições \pm desvio padrão.



Figuras 4. Níveis de NAD (A), NADP(B), NADH (C), NADPH (D) e de clorofilas (E) bem como eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II, F_v/F_m (F) em rosetas de plantas de *Arabidopsis* cultivadas com selenato de sódio. O asterisco indica que houve diferença significativa em nível de 5% pelo teste t entre as plantas tratadas com Se e as plantas do controle. Médias de 6 repetições \pm desvio padrão.

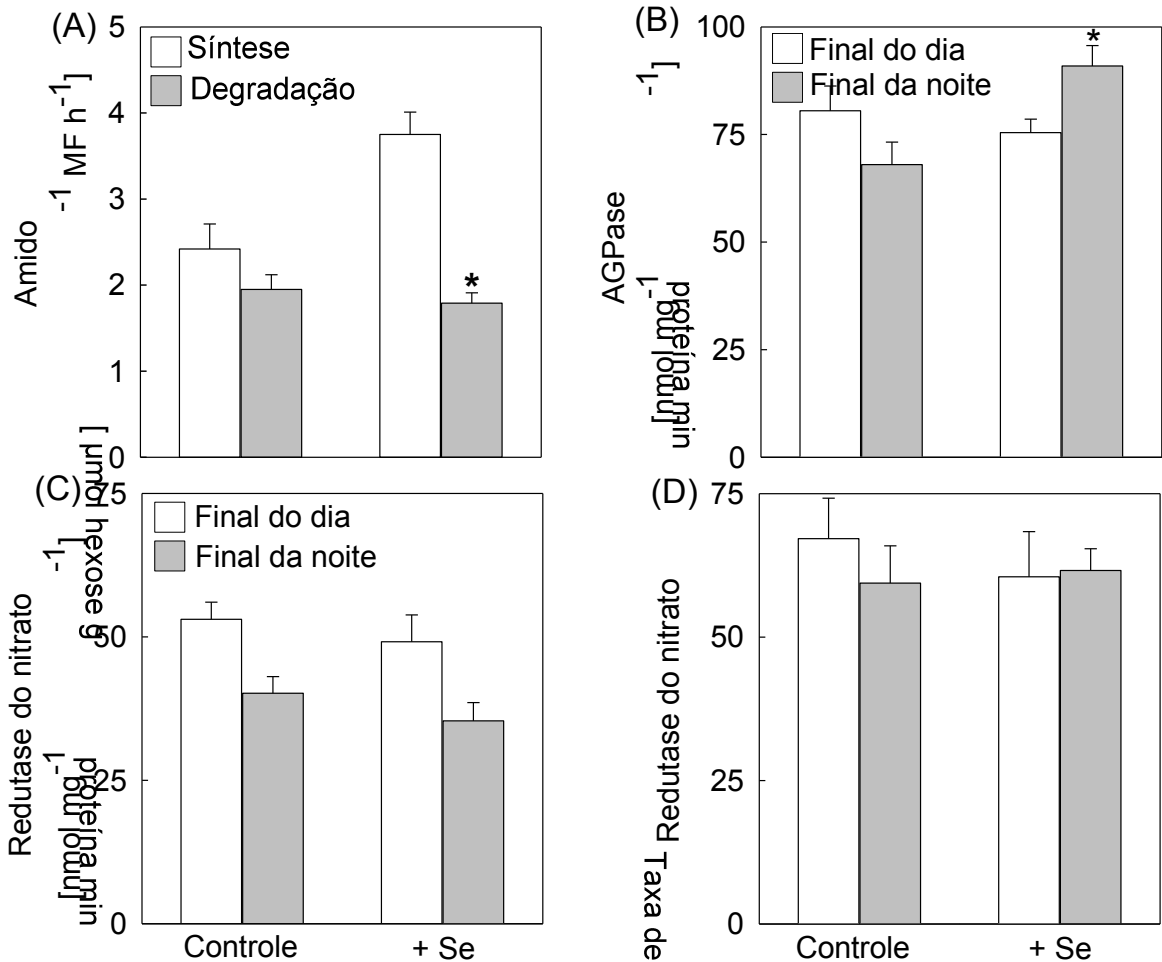


Figura 5. Quantidade de amido (A), atividade da AGPase (B), atividade (C) e taxa de ativação (D) da redutase do nitrato. O asterisco indica que houve diferença significativa em nível de 5% pelo teste t entre as plantas tratadas com selenato de sódio e as plantas do controle. Médias de 6 repetições \pm desvio padrão.

e a degradação do amido (durante o período da noite), o que possivelmente contribuiu para as alterações observadas no crescimento. A exposição das plantas à solução de selenato de sódio, à concentração de 50 μ M, levou a um aumento na atividade da AGPase durante o final do período noturno (Fig. 5B). Contrariamente ao metabolismo do amido, o Se não promoveu alterações significativas na atividade da redutase do nitrato e na taxa de ativação da redutase do nitrato (Fig. 5C, D).

Para um melhor entendimento das alterações descritas acima no crescimento e no metabolismo primário das plantas de *Arabidopsis*, o perfil metabólico foi determinado nas folhas da roseta e nas raízes das plantas tratadas com selenato de sódio (Tabela 2). Os

principais metabólitos que tiveram sua concentração relativa alterada, tanto na parte aérea quanto na raiz das plantas tratadas com Se foram os aminoácidos asparagina, GABA, glutamato, glutamina e valina (Tabela 2). Registra-se que o aminoácido não protéico GABA foi o único cuja concentração relativa aumentou ao passo que os demais sofreram reduções em suas concentrações. Em adição, os níveis de treonina e triptofano foram reduzidos em aproximadamente 70 % em plantas tratadas com Se, redução essa observada somente na parte aérea. O conteúdo radicular dos aminoácidos homoserina e serina aumentou cerca de 30 % nas plantas tratadas com Se. Ademais, verificou-se também uma redução significativa (40 %) na quantidade de isoleucina e lisina. Embora as alterações na quantidade desses aminoácidos tenham sido observadas, não se verificou alterações no conteúdo total de aminoácidos (Fig. 3D), demonstrando um grande tamponamento dos níveis de aminoácidos totais em resposta ao Se.

De maneira geral, o conteúdo relativo de ácidos orgânicos foi reduzido nas plantas tratadas com Se. Assim, os níveis de ácido ascórbico foram reduzidos em cerca de 50%, tanto na parte aérea quanto na raiz (Tabela 2). Na parte aérea, os níveis de 2-oxoglutarato e ácido isocítrico foram reduzidos em aproximadamente 50% e 70%, respectivamente. Na raiz, observaram-se reduções no conteúdo de ácido benzóico e ácido láctico de 30% e 70%, respectivamente. Detectou-se a presença de alguns açúcares e de seus derivados, embora apenas os níveis de frutose e glicose apresentaram reduções significativas (cerca de 60% na parte aérea e 30% na raiz). A quantidade de putrescina e espermidina foi reduzida em aproximadamente 45% no sistema radicular das plantas tratadas com Se.

A modulação da biossíntese e degradação do amido parece ser um importante fator que pode influenciar a coordenação da assimilação de carbono e o crescimento das plantas de *Arabidopsis* tratadas com selenato de sódio. Assim, estimou-se o índice de tolerância ao Se, mediante avaliação do crescimento radicular em plantas de *Arabidopsis thaliana* do tipo selvagem (Col-0) e em mutantes contrastantes na biossíntese de amido, *pgm* e *sex₁₋₄*, cultivadas sob duas concentrações de Se. Na figura 6, observa-se que as plântulas do mutante *pgm* responderam de modo distinto ao aumento da concentração de Se no meio de crescimento. Neste contexto, dos três genótipos, as plantas do mutante *pgm* mostraram-se as mais tolerantes ao Se. Com o intuito de se investigar mais detalhadamente o efeito do Se no metabolismo de carboidratos, plantas de *Arabidopsis* do tipo selvagem (Col-0) e plantas dos mutantes *pgm* e *sex₁₋₄* foram tratadas com Se e os aspectos bioquímicos foram analisados. Soba ação do Se, a massa seca da parte aérea e da raiz bem como a taxa de

Tabela 2: Metabólitos encontrados na parte aérea e no sistema radicular de *Arabidopsis thaliana* tratadas com selenato de sódio.

Metabólito	Parte aérea		Raiz	
	Controle	+ Selênio	Controle	+ Selênio
Aminoácidos				
β -Alanina	1.00 \pm 0.21	0.79 \pm 0.17	1.00 \pm 0.09	0.76 \pm 0.15
Alanina	1.00 \pm 0.23	0.95 \pm 0.20	1.00 \pm 0.08	0.66 \pm 0.13
Arginina	1.00 \pm 0.10	0.97 \pm 0.08	1.00 \pm 0.06	0.88 \pm 0.10
Asparagina	1.00 \pm 0.06	0.42\pm0.07*	1.00 \pm 0.05	0.70\pm0.08*
Aspartato	1.00 \pm 0.14	0.74 \pm 0.13	1.00 \pm 0.07	0.80 \pm 0.14
Cisteína	1.00 \pm 0.07	1.02 \pm 0.05	-	-
GABA	1.00 \pm 0.17	2.27\pm0.15*	1.00 \pm 0.06	1.42\pm0.10*
Glutamato	1.00 \pm 0.08	0.37\pm0.06*	1.00 \pm 0.08	0.48\pm0.04*
Glutamina	1.00 \pm 0.11	0.47\pm0.03*	1.00 \pm 0.11	1.67\pm0.11*
Glicina	1.00 \pm 0.18	0.77 \pm 0.10	1.00 \pm 0.16	0.95 \pm 0.14
Homoserina	1.00 \pm 0.12	0.91 \pm 0.16	1.00 \pm 0.11	1.37\pm0.09*
Isoleucina	1.00 \pm 0.14	0.82 \pm 0.13	1.00 \pm 0.14	0.52\pm0.08*
Lisina	1.00 \pm 0.11	0.88 \pm 0.17	1.00 \pm 0.07	0.35\pm0.04*
Metionina	1.00 \pm 0.25	0.73 \pm 0.12	1.00 \pm 0.15	1.02 \pm 0.24
Ornitina	1.00 \pm 0.16	0.89 \pm 0.14	1.00 \pm 0.13	0.88 \pm 0.09
Fenilalanina	1.00 \pm 0.17	1.25 \pm 0.24	1.00 \pm 0.19	0.92 \pm 0.17
Prolina	1.00 \pm 0.08	1.66 \pm 0.08	1.00 \pm 0.03	0.97 \pm 0.11
Serina	1.00 \pm 0.03	1.01 \pm 0.03	1.00 \pm 0.10	1.38\pm0.11*
Treonina	1.00 \pm 0.05	0.29\pm0.05*	1.00 \pm 0.15	1.09 \pm 0.21
Triptofano	1.00 \pm 0.06	0.28\pm0.04*	1.00 \pm 0.13	0.84 \pm 0.16
Tirosina	1.00 \pm 0.21	0.76 \pm 0.07	1.00 \pm 0.11	0.89 \pm 0.17
Valina	1.00 \pm 0.10	0.52\pm0.07*	1.00 \pm 0.07	0.56\pm0.08*
Ácidos orgânicos				
Ácido ascórbico	1.00 \pm 0.11	0.44\pm0.07*	1.00 \pm 0.04	0.55\pm0.05*
Aconitato	-	-	1.00 \pm 0.06	1.72\pm0.08*
Ácido benzoico	1.00 \pm 0.07	0.98 \pm 0.11	1.00 \pm 0.09	0.65\pm0.10*
Ácido cítrico	1.00 \pm 0.15	0.84 \pm 0.17	1.00 \pm 0.12	0.93 \pm 0.11
Ácido fumárico	1.00 \pm 0.12	0.83 \pm 0.23	1.00 \pm 0.13	0.89 \pm 0.18
2OG	1.00 \pm 0.11	0.46\pm0.06*	1.00 \pm 0.19	0.84 \pm 0.12
Ácido glicérico	1.00 \pm 0.26	0.88 \pm 0.14	1.00 \pm 0.14	1.03 \pm 0.18
Ácidoisocítrico	1.00 \pm 0.06	0.29\pm0.05*	1.00 \pm 0.11	1.10 \pm 0.17
Ácidolático	1.00 \pm 0.26	0.95 \pm 0.21	1.00 \pm 0.09	0.30\pm0.05*
Ácidomálico	1.00 \pm 0.26	0.84 \pm 0.12	1.00 \pm 0.17	1.07 \pm 0.16
Ácido pirúvico	1.00 \pm 0.15	0.71 \pm 0.14	1.00 \pm 0.09	0.89 \pm 0.08
Ácido succínico	1.00 \pm 0.12	0.89 \pm 0.16	1.00 \pm 0.07	0.95 \pm 0.12
Açúcares e derivados				
Frutose	1.00 \pm 0.08	0.41\pm0.06*	1.00 \pm 0.06	0.38\pm0.07*
Galactose	1.00 \pm 0.11	0.97 \pm 0.10	1.00 \pm 0.21	0.74 \pm 0.18
Glicose	1.00 \pm 0.11	0.61\pm0.09*	1.00 \pm 0.05	0.57\pm0.04*
3-P-Glicerato	1.00 \pm 0.16	0.87 \pm 0.06	1.00 \pm 0.19	1.03 \pm 0.28
Sacarose	1.00 \pm 0.22	0.80 \pm 0.15	1.00 \pm 0.16	0.85 \pm 0.14
Poliaminas				
Putrescina	1.00 \pm 0.11	0.91 \pm 0.17	1.00 \pm 0.07	0.51\pm0.04*
Espermidina	1.00 \pm 0.13	0.82 \pm 0.09	1.00 \pm 0.06	0.58\pm0.05*

O asterisco indica que houve diferença significativa em nível de 5% pelo teste t entre as plantas tratadas com Se e as plantas do controle. Médias de 6 repetições \pm desvio padrão.

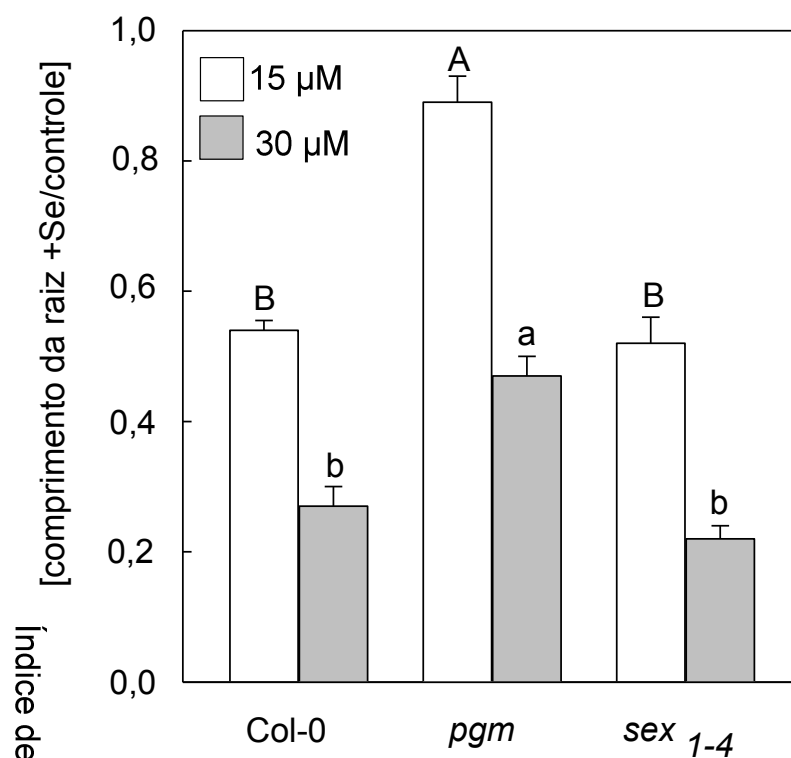


Figura 6. Índice de tolerância ao selênio em plantas de *Arabidopsis* tratadas com selenato de sódio. Médias seguidas de mesma letra maiúscula ou minúscula entre os genótipos utilizados dentro do mesmo tratamento, não diferem entre si, em nível de 5 % pelo teste de Tukey. Médias de 6 repetições \pm erro da média.

crescimento relativo das plantas Col-0 e *sex*₁₋₄ foram reduzidas, independente do fotoperíodo utilizado (Fig. 7A, B, D, E, F, H). O tratamento com Se não reduziu a razão parte aérea:raiz das plantas do tipo selvagem e do mutante *sex*₁₋₄ (Fig. 7C, G). Interessante, a massa seca da roseta, a massa seca da raiz, a razão parte aérea: raiz e a taxa de crescimento relativo das plantas do mutante *pgm* não foram afetadas pelo tratamento com Se, sob condição de dia curto ou de dia longo (Fig. 7A-H).

Em *Arabidopsis*, o aumento na razão clorofila a/b parece estar associado com o processo de degradação de clorofila em plantas quando submetidas a condições de estresse abiótico. Registra-se, no entanto, que o Se não promoveu danos visíveis (aspectos cloróticos) nem alterações significativas na eficiência fotoquímica (F_v/F_m) nos genótipos avaliados (dados não mostrados). Juntos, esses resultados indicam que a aplicação de Se promoveu reduções nos teores de clorofilas totais nos genótipos *pgm* e *sex*₁₋₄ sem ocasionar, no entanto, danos ao aparato fotossintético. Os níveis de clorofila a permaneceram estáveis nas plantas do tipo selvagem tratadas com Se (Fig. 8A). Por outro

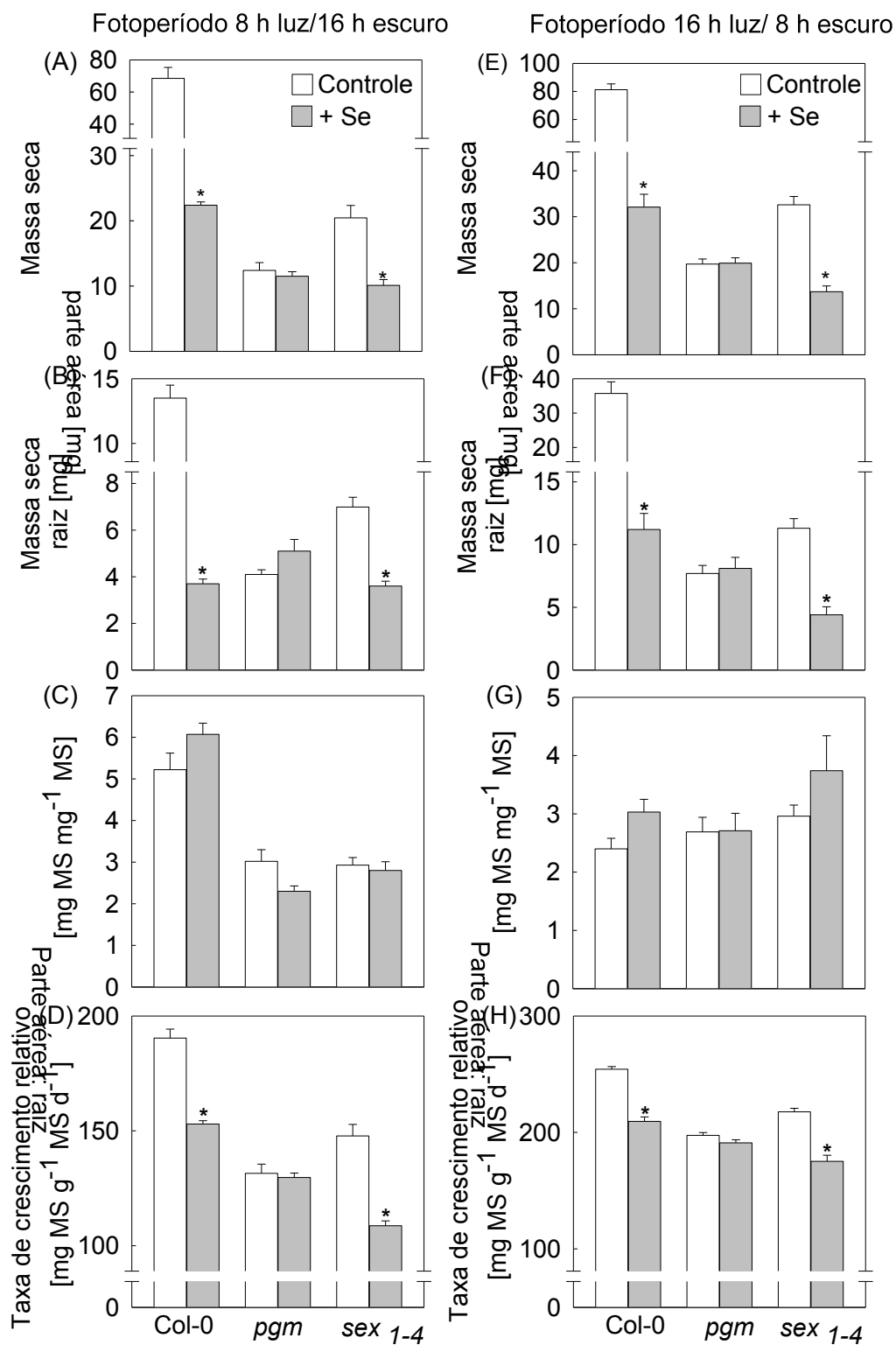


Figura 7. Massa seca da parte aérea (A, E), massa seca da raiz (B, F), razão parte aérea: raiz (C, G), taxa de crescimento relativo (D, H) das plantas Col-0, *pgm* e *sex 1-4* tratadas com Se cultivadas em fotoperíodo de 8 h/16 h ou 16 h/8 h de luz/escuro, respectivamente. O asterisco indica que houve diferença significativa em nível de 5% pelo teste t entre as plantas tratadas com Se e as plantas do controle. Médias de 6 repetições \pm desvio padrão.

lado, os níveis de clorofila a foram ligeiramente reduzidos em plantas dos mutantes *pgm* e *sex1-4* tratadas com Se (Fig. 8A). Sob tratamento com Se, também foi observada uma redução nos níveis de clorofila b nas plantas do tipo selvagem e nos mutantes *pgm* e *sex1-4* (Fig. 8B). Ademais, o Se ocasionou redução significativa nos teores de clorofilas totais (a+b) nos mutantes *pgm* e *sex1-4*, mas não nas plantas do tipo selvagem (Fig. 8C). Incrementos significativos na razão clorofila a/b foram observados na roseta das plantas de *Arabidopsis* ao final do período do experimento (Fig. 8D).

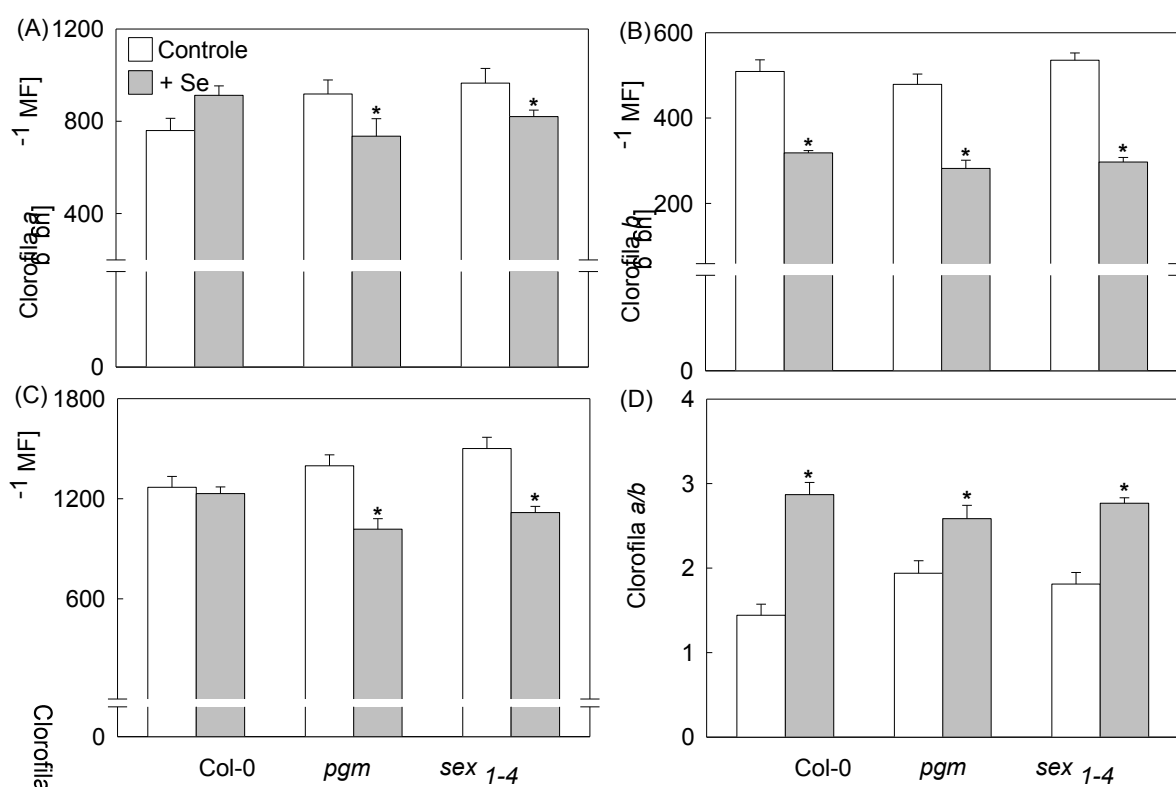


Figura 8. Conteúdo de clorofila a (A), clorofila b (B), clorofilas totais (C) e razão clorofila a/b (D) das plantas Col-0, *pgm* e *sex1-4* tratadas com selenato de sódio, à concentração de 50 μM . O asterisco indica que houve diferença significativa em nível de 5% pelo teste t entre as plantas tratadas com Se e as plantas do controle. Médias de 6 repetições \pm desvio padrão.

Os níveis de glicose 6 fosfato (Fig. 9A) e frutose 6 fosfato (Fig. 9B) aumentaram significativamente apenas no mutante *pgm* cultivado com Se. Por outro lado, os níveis de glicose 1 fosfato (Fig. 9C) não variaram significativamente nas plantas de *Arabidopsis* tratadas com Se. Ademais, o Se reduziu a atividade inicial da rubisco em 10 %,

60 % e 5 %

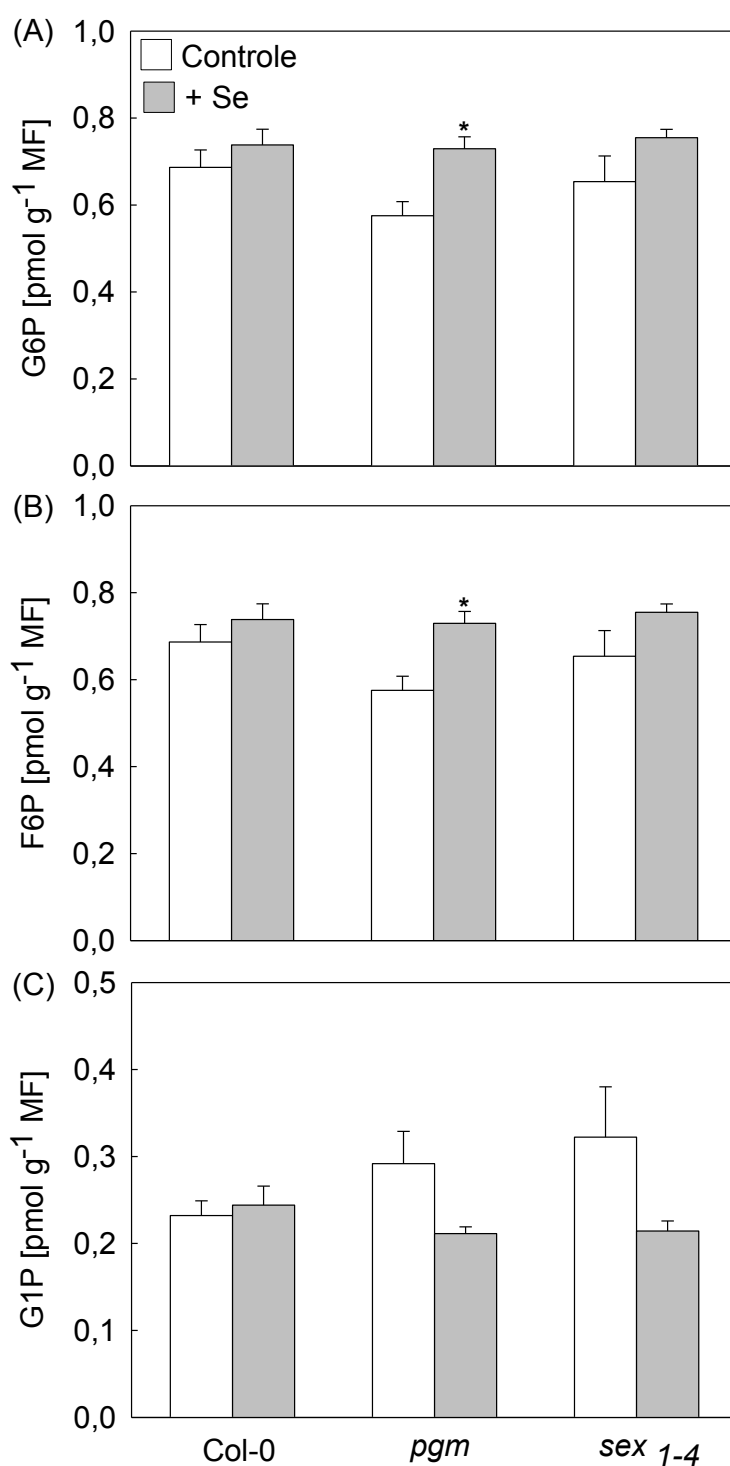


Figura 9. Níveis de Glicose 6 fosfato (G6P) (A), Frutose 6 fosfato (F6P) (B) e Glicose 1 fosfato (G1P) (C) em plantas Col-0, *pgm* e *sex*₁₋₄ tratadas com selenato de sódio, à concentração de 50 μ M. O asterisco indica que houve diferença significativa em nível de 5% pelo teste t entre as plantas tratadas com Se e as plantas do controle. Médias de 6 repetições \pm desvio padrão.

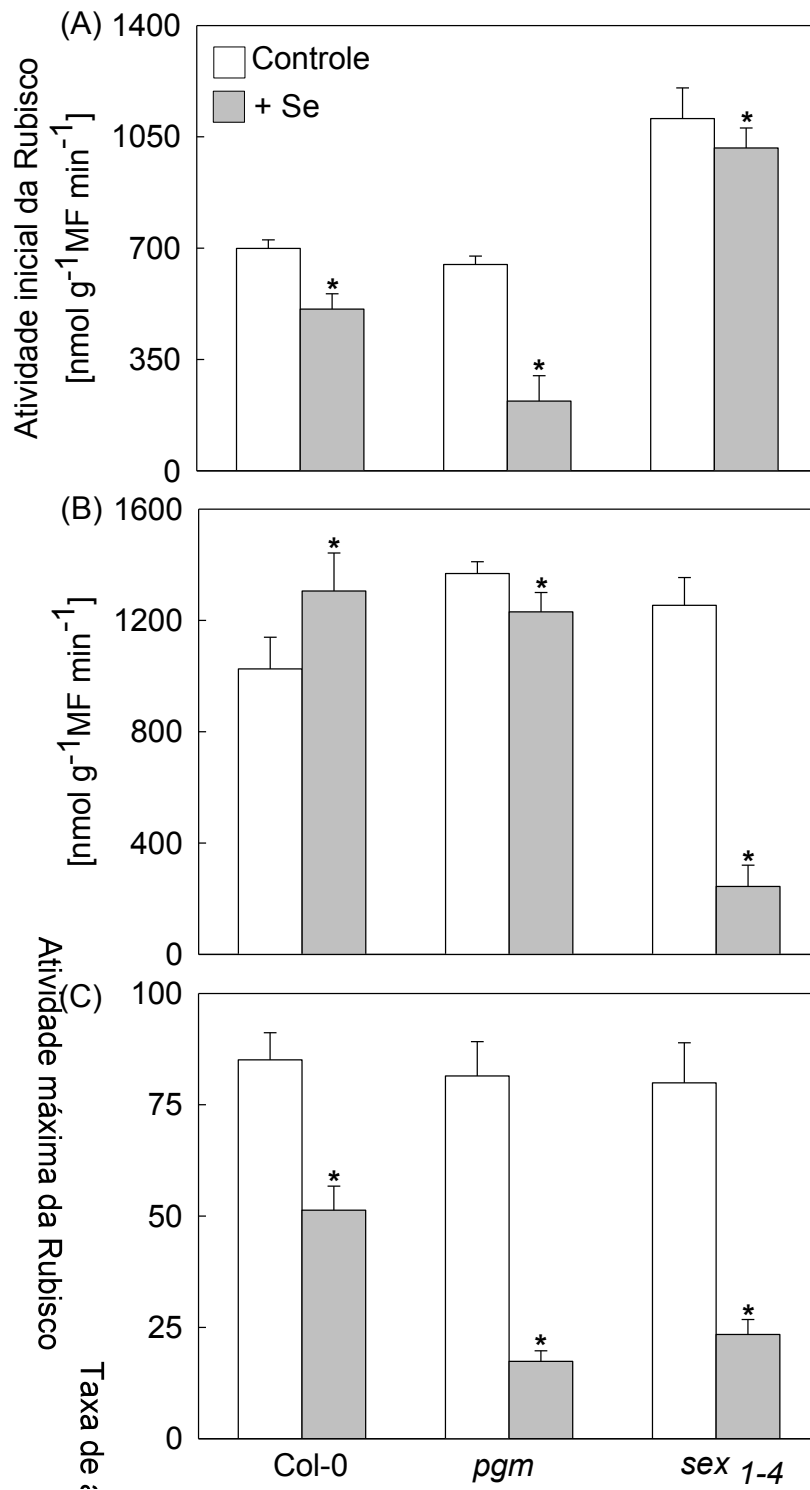


Figura 10. Atividade inicial da rubisco (A), atividade máxima da rubisco (B) e taxa de ativação da rubisco (C) em plantas Col-0, *pgm* e *sex*₁₋₄ tratadas com selenato de sódio, à concentração de 50 μM. O asterisco indica que houve diferença significativa em nível de 5% pelo teste t entre as plantas tratadas com Se e as plantas do controle. Médias de 6 repetições ± desvio padrão.

nas plantas do tipo selvagem e nos mutantes *pgm* e *sex*₁₋₄, respectivamente (Fig. 10A). Por outro lado, o Se promoveu um pequeno aumento na atividade máxima da rubisco nas plantas do tipo selvagem (Fig. 10B). Plantas do mutante *pgm* tratadas com Se apresentaram uma leve redução na atividade máxima da rubisco. Entretanto, a atividade máxima da rubisco foi inibida fortemente por solução de Se nas plantas *sex*₁₋₄ (Fig. 10B). Não

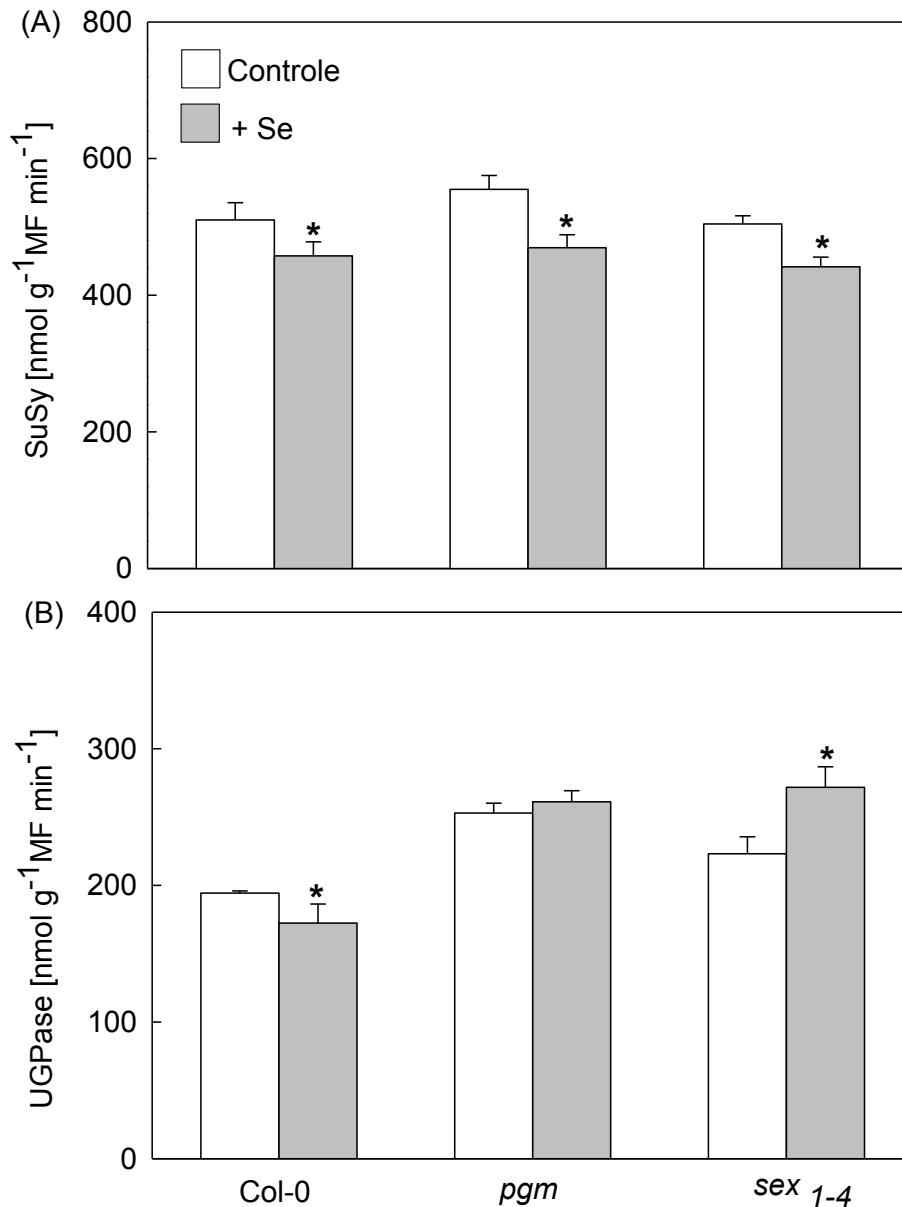


Figura 11. Atividade da sacarose sintase (SuSy) (A) e UGPase (B) em plantas Col-0, *pgm* e *sex*₁₋₄ tratadas com selenato de sódio. O asterisco indica que houve diferença significativa em nível de 5% pelo teste t entre as plantas tratadas com Se e as plantas do controle. Médias de 6 repetições \pm desvio padrão.

obstante, a taxa de ativação da rubisco foi significativamente reduzida sob ação do Senas plantas Col-0 (30%), *pgm* (65%) e *sex*₁₋₄(55%) em relação as plantas do controle (Fig. 10C). Sob ação do Se, a atividade da SuSy foi inibida em 10% nas plantas Col-0 e *sex*₁₋₄ e em 20% no mutante *pgm* (Fig 11A). A atividade da UGPase foi reduzida em 7 % nas plantas Col-0, ao passo que, no mutante *sex*₁₋₄ a atividade da UGPase foi estimulada com incremento de 12% (Fig 11B). Ademais, a atividade da UGPase não foi alterada nas

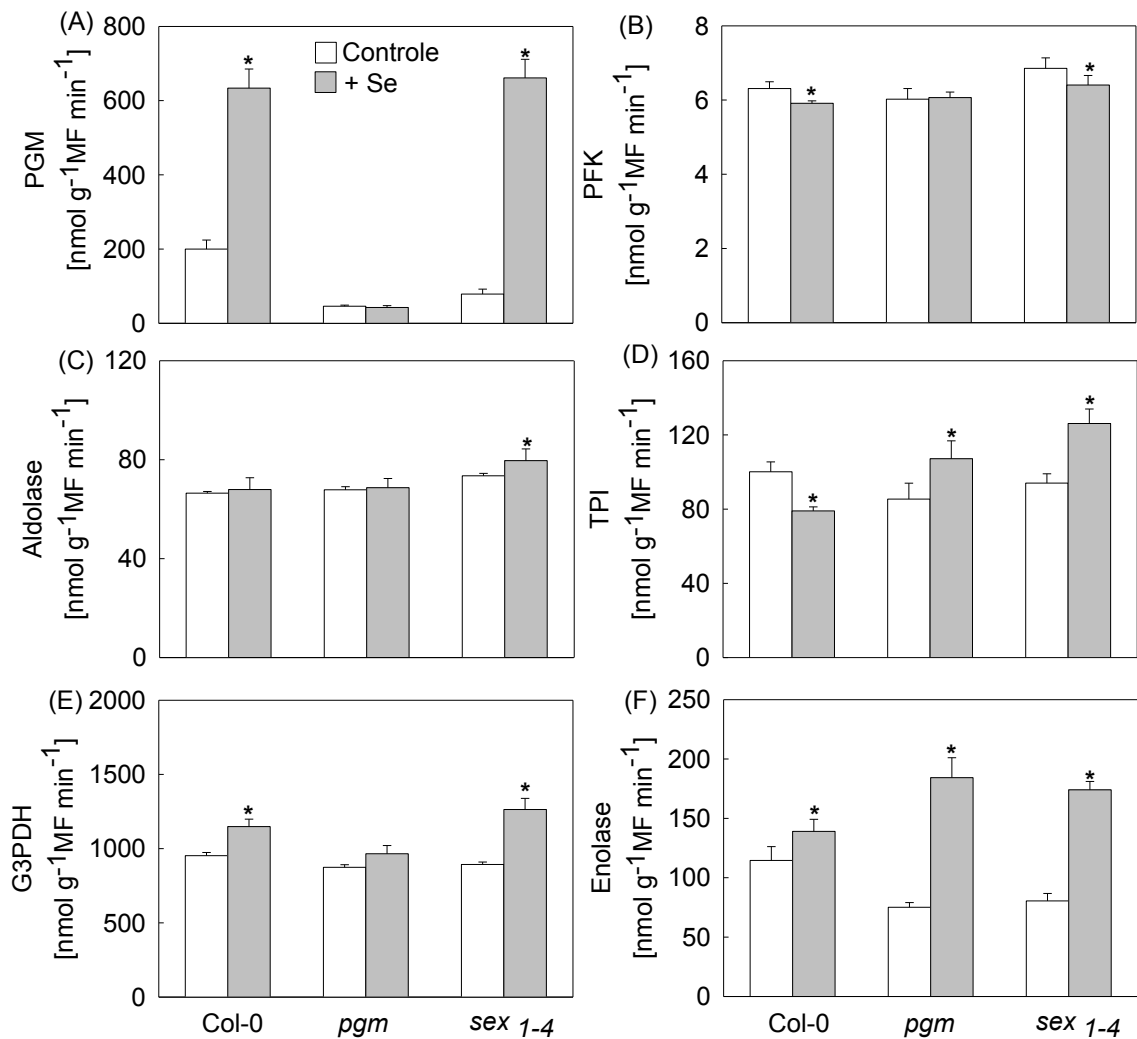


Figura 12. Atividade da fosfoglicomutase (PGM) (A), fosfofruto quinase (PFK) (B), aldolase (C), triose fosfato isomerase (TPI) (D), glicerol aldeído 3 fosfato desidrogenase (G3PDH) (E) e enolase (F). O asterisco indica que houve diferença significativa em nível de 5% pelo teste t entre as plantas tratadas com Se e as plantas do controle. Médias de 6 repetições \pm desvio padrão.

plantas do mutante *pgm* cultivadas com Se. A atividade da enzima PGM foi aumentada nas plantas Col-0 e *sex1-4* cultivadas com Se (Fig. 12A). Por outro lado, a atividade da PGM não foi alterada nas plantas do mutante *pgm* tratadas com Se. A atividade das enzimas PFK e aldolase comportou de forma similar em todos os genótipos com pouca ou nenhuma influência de Se (Fig. 12B, C). Sobação do Se, observou-se aumentos na atividade da

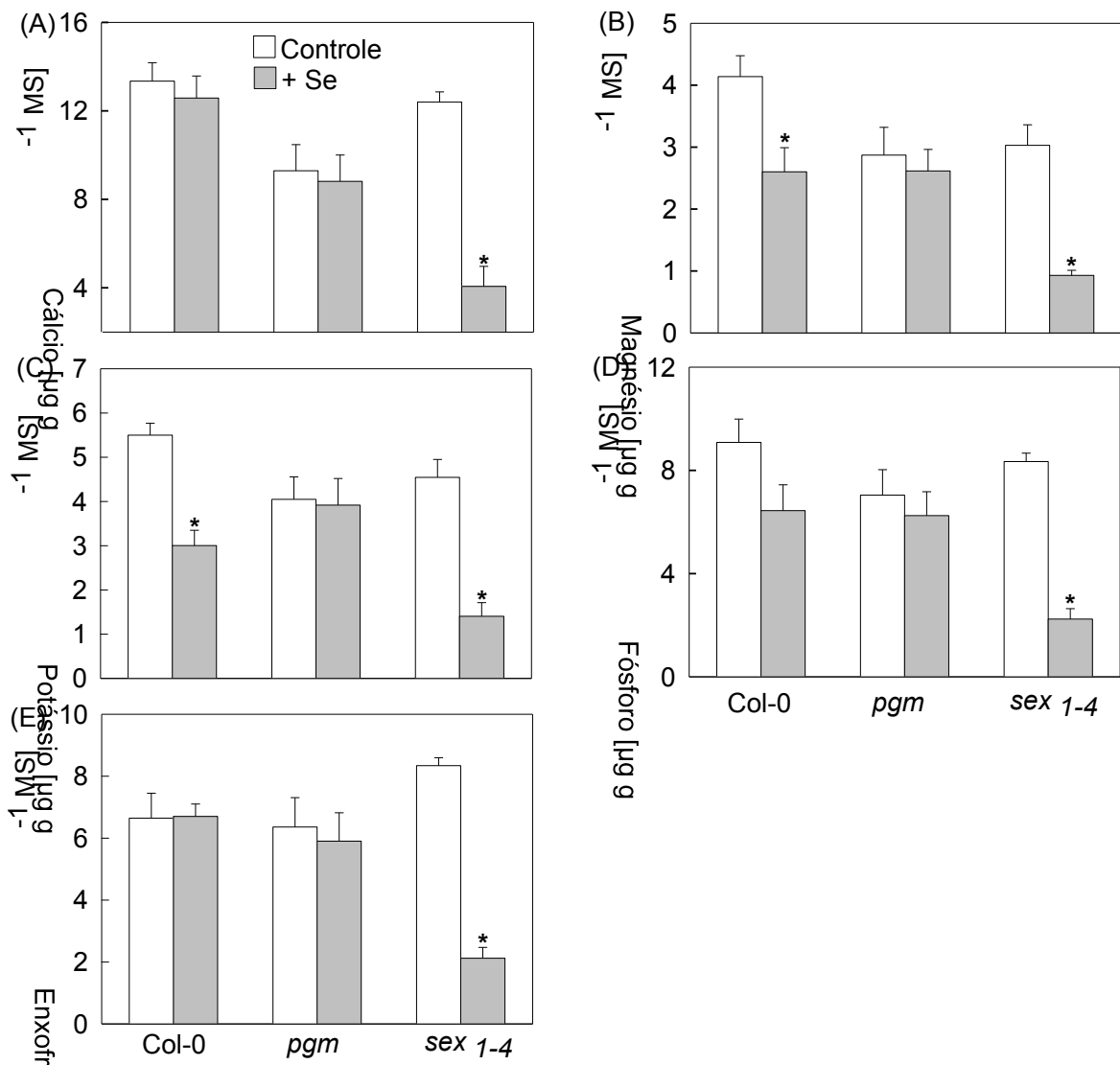


Figura 13. Níveis de cálcio (A), magnésio (B), potássio (C), fósforo (D) e enxofre (E) em plantas de *Arabidopsis thaliana* cultivadas com selenato de sódio. O asterisco indica que houve diferença significativa em nível de 5% pelo teste t entre as plantas tratadas com Se e as plantas do controle. Médias de 6 repetições \pm desvio padrão.

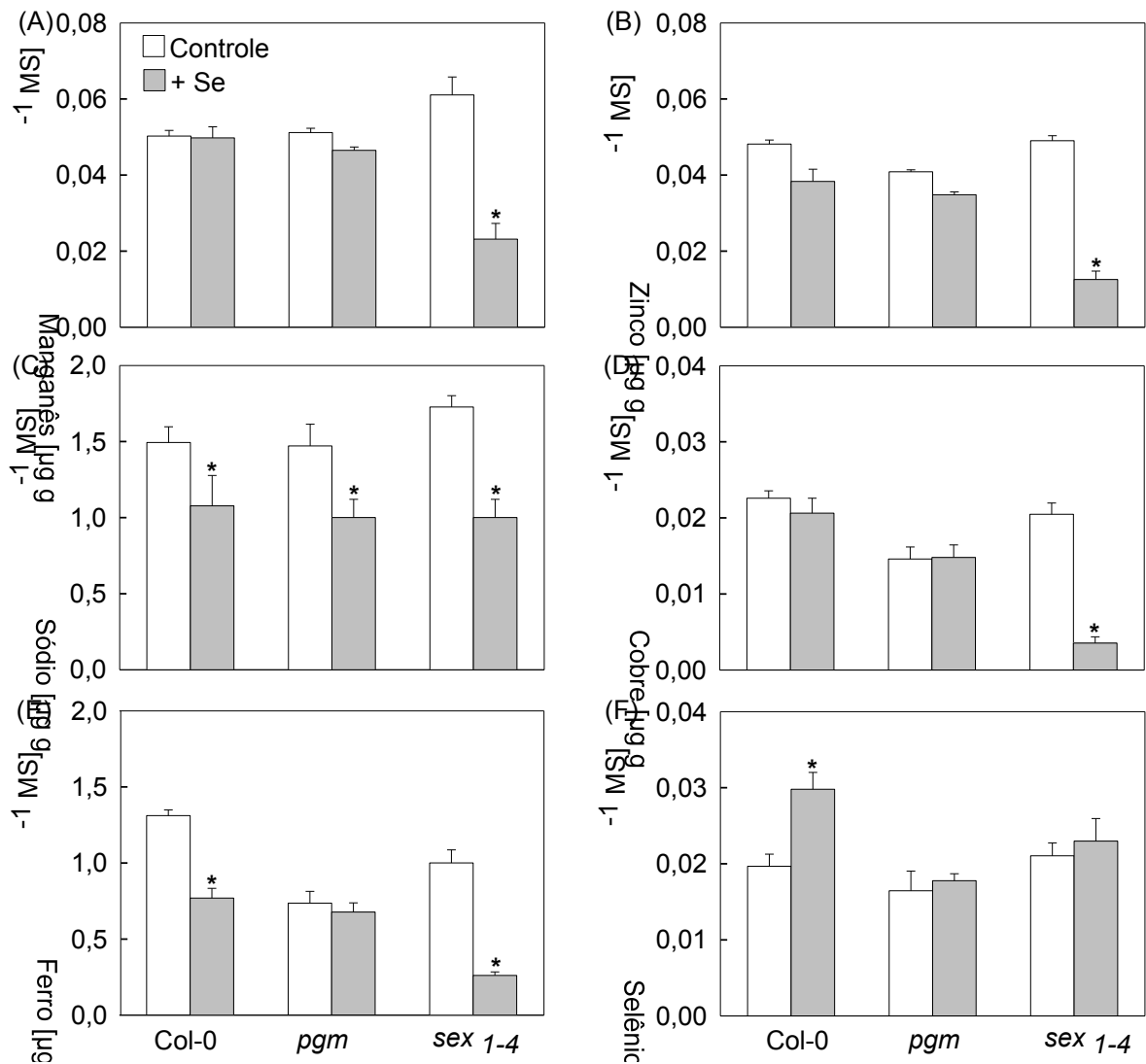


Figura 14. Níveis de manganês (A), zinco (B), sódio (C), cobre (D) ferro (E) e selênio (F) em plantas de *Arabidopsis thaliana* tratadas com selenato de sódio. O asterisco indica que houve diferença significativa em nível de 5% pelo teste t entre as plantas tratadas com Se e as plantas do controle. Médias de 6 repetições \pm desvio padrão.

TPI nos mutantes *pgm* e *sex₁₋₄* de aproximadamente 15% e 20 %, respectivamente, e redução de cerca de 10% nas plantas do tipo selvagem (Fig. 12D). Atividade da G3PDH foi aumentada a 15% e 24% nas plantas *Col-0* e *sex₁₋₄*, respectivamente, após a incubação com Se (Fig. 12E). Além disso, a atividade da G3PDH nas plantas do mutante *pgm* submetidas à solução de Se não diferiu significativamente das plantas do controle. Sem adição de Se, a atividade da enzima enolase foi menor nos genótipos *pgm* e *sex₁₋₄* em relação às plantas do tipo selvagem (Fig. 12F). Ademais, o Se aumentou a

atividade da enzima enolase em 12%, 80% e 60% nas plantas Col-0, *pgm* e *sex₁₋₄*, respectivamente.

A concentração de cálcio não foi alterada nas plantas do tipo selvagem e no mutante *pgm* cultivadas com Se (Fig. 13A). Por outro lado, o conteúdo de cálcio foi reduzido nas plantas do mutante *sex₁₋₄* tratadas com solução de Se, em relação as plantas do tipo selvagem (Fig. 13A). A exposição das plantas Col-0 e *sex₁₋₄* a solução de selenato de sódio, à concentração de 50 μ M, levou a uma redução significativa nos níveis de magnésio nos tecidos daquelas plantas (Fig. 13 B). Por outro lado, o Se não alterou a concentração de magnésio na roseta das plantas do mutante *pgm*. Sob ação do Se, a concentração de potássio foi reduzida nos tecidos das plantas do tipo selvagem e no mutante *sex₁₋₄* (Fig. 13C). Ademais, o Se não alterou a concentração de potássio nos tecidos do mutante *pgm*. No entanto, os níveis de fósforo e enxofre não foram significativamente afetados nas plantas Col-0 e *pgm* tratadas com Se, em comparação com os das plantas controle (Fig. 13D, E). Entretanto, os níveis de fósforo e de enxofre foram fortemente reduzidos nas plantas do mutante *sex₁₋₄* tratadas com Se.

Sob ação do Se, as concentrações de manganês, zinco, cobre e ferro foram significativamente reduzidas nos tecidos do mutante *sex₁₋₄* quando comparadas as plantas do controle (Fig. 14A, B, D, E). As concentrações de ferro foram reduzidas em 30 % nos tecidos da roseta das plantas do tipo selvagem. Entretanto, os níveis de Se aumentou em 15 % nos tecidos das plantas do tipo selvagem cultivadas com Se, enquanto se manteve estável nos mutantes *pgm* e *sex₁₋₄*, exposto à solução de Se (Fig. 14F). Os teores de Na foram reduzidos em todos os genótipos tratados com Se (Fig. 14C). Interessante, os níveis de manganês, zinco, cobre e ferro nos tecidos das plantas do mutante *pgm* tratadas com Se foi semelhante ao das plantas do controle cultivadas sem Se (Fig. 14A, B, D, E).

5. DISCUSSÃO

Embora alguns efeitos do Se sobre o crescimento já tenham sido observados em *Lactuca sativa* (Rios et al 2008, Ramos et al 2010), *Lolium multiflorum* (Hartikainen et al 2000) e em outras espécies vegetais (White et al 2007, Feng et al 2009) pouco se conhece acerca dos impactos do Se no metabolismo primário das plantas. Neste contexto, esse trabalho apresenta evidências da ação do Se no metabolismo central em *Arabidopsis thaliana*, contribuindo significativamente para o entendimento da função do Se nas plantas. O efeito do Se, aplicado na forma de selenato de sódio, em *Arabidopsis thaliana* foi

observado mediante redução na germinação das sementes, bem como, na inibição no crescimento da radícula das plantas (Fig.1). A exposição das plantas de Arabidopsis do tipo selvagem a Se, à concentração de 50 μ M, promoveu uma redução na massa seca da raiz e da parte aérea comprometendo grandemente a taxa de crescimento relativo (Figs.2, 3). Ademais, o Se promoveu algumas alterações em uma gama de metabólitos associados ao metabolismo de ácidos orgânicos e açúcares; além de alterar o metabolismo do amido e enzimas relacionados a assimilação de carbono (Figs 3, 5, 10, 11, 12 e Tabela 2). Em conjunto, esses resultados apresentam novos pontos da ação do Se na regulação do metabolismo primário das plantas.

A redução na germinação das sementes e no crescimento das plantas cultivadas com Se, pode ser interpretada como uma função dos impactos provocados pelo Se no metabolismo central das plantas. Salienta-se também que o Se pode ser tóxico ao metabolismo celular, pois dada a sua semelhança química com S, o Se pode substituir de forma não específica o S em proteínas sulfuradas (Stadtman 1996, Hajiboland and Amjad 2007). Entretanto, o Se, à concentração de 50 μ M, não promoveu alterações significativas na razão F_v/F_m e nos níveis de NAD(P)H (Fig 4). Assim, estes resultados fornecem evidências convincentes de que a redução na biomassa não foi uma consequência de uma redução na taxa de fotossíntese ou na taxa de respiração por se. Neste contexto, a expressiva redução da biomassa das plantas de Arabidopsis do tipo selvagem tratadas com Se com pouca alteração nos níveis de sacarose, aminoácidos totais e proteínas (Fig. 3), associado com pequenas modificações na atividade de diversas enzimas do metabolismo do carbono (Figs. 10, 11, 12) sugerem que o Se parece desacoplar o metabolismo primário do crescimento das plantas.

A ocorrência de estresse abiótico, tais como nutricional e hídrico, promove uma extensa reprogramação metabólica nas plantas (Charlton et al 2008, Feng et al 2009, Araújo et al 2011, Obata e Fernie 2012). É importante mencionar que algumas alterações metabólicas claramente observadas nesse estudo são característica desse reajuste metabólico em resposta a estresses, tal como o desbalanço entre a síntese e a degradação do amido, observado nas plantas cultivadas com Se (Fig.5). A taxa de consumo de amido é considerada um diagnóstico para a regulação da fotossíntese (Sulpice et al 2009, Stitt et al 2010). Plantas do tipo selvagem tratadas com Se apresentaram significativa alteração entre a taxa de biossíntese e de degradação do amido, quando comparado com as plantas do controle (Fig. 5). Assim, o status de carbono na parte aérea das plantas tratadas com Se pode ser interpretado como resultado da expansão da roseta sendo mais afetada em relação ao

influxo de carbono. Esses resultados sugerem, novamente, um desacoplamento entre a disponibilidade de carbono e o crescimento das plantas cultivadas com Se. Interessante, a biomassa das plantas do mutante *pgm* não foi afetada pelo tratamento com Se, independente do fotoperíodo utilizado (Fig. 7). Em contraste ao mutante *pgm*, a massa seca da parte aérea e da raiz das plantas do mutante *sex₁₋₄* foram significativamente reduzidas pela ação do Se (Fig. 7). Resta, portanto, compreender como os níveis de Se são detectados nas plantas do mutante *pgm*, com reduzida biossíntese de amido, e como a estreita coordenação do crescimento e do metabolismo é alcançada nas plantas do mutante *sex₁₋₄*.

Plantas não acumuladoras de Se têm em seus tecidos menos de 100 mg de Se Kg⁻¹ MS (Sors et al 2005, Barillas et al 2011). Embora, essas plantas possuam mecanismos de absorção desse elemento, elas são incapazes de tolerar Se em concentrações relativamente baixas em seus tecidos. Registre-se, no entanto, que a concentração de Se capaz de promover toxicidade às plantas está associada à capacidade de absorção intrínseca de cada espécie e, com a relação do conteúdo de sulfato e selênio presente na rizosfera das plantas (Pilon-Smits e Quin 2010). Assim, algumas plantas podem tolerar o Se restringindo sua absorção na raiz (Li et al 2008). Como exemplo, plantas de trigo (*Triticum aestivum*) são mais tolerantes ao Se, em relação a outras plantas não acumuladoras, tais como *Arabidopsis*, *Brassica oleracea* e *Lactuca sativa*, por restringir a absorção desse elemento pela raiz. Modificações morfofisiológicas observadas na parte aérea das plantas podem ser causadas por acúmulo excessivo de Se, possivelmente ocorrido via mecanismo de absorção similar ao utilizado pelo enxofre (Govasmark et al 2008, Feng et al 2009). Neste contexto, os resultados aqui obtidos demonstraram que a concentração de Se aumentou apenas nos tecidos das plantas do tipo selvagem (Fig. 14), ao passo que, a concentração de enxofre diminuiu apenas nas plantas do mutante *sex₁₋₄* tratadas com Se (Fig. 13). Por seu turno, a concentração de Se encontrada nos tecidos das plantas do tipo selvagem e nos mutantes *sex₁₋₄* e *pgm* foram relativamente baixa, assim, torna-se pouco provável que o Se possa interferir na formação de pontes dissulfídricas das S-proteínas.

O crescimento e desenvolvimento das plantas é, também, conhecido por ser dependente da absorção de macro e micronutriente (Guerrero et al 2014). Neste contexto, o Se reduziu os níveis de cálcio, magnésio, potássio, fósforo e enxofre nos tecidos foliares do mutante *sex₁₋₄* (Fig. 13). Considerando que o cálcio é essencial à formação de parede celular, agindo conjuntamente com o potássio e fósforo para manter a sua integridade (Pittman 2005); a redução no crescimento das plantas do mutante *sex₁₋₄* parece ter sido afetada pela redução na capacidade de acúmulo desses macronutrientes.

Ademais, o Se reduziu significativamente os níveis de manganês, zinco, cobre e ferro nos tecidos da roseta do mutante *sex₁₋₄* (Fig.14). Juntos esses resultados indicam que o Se parece modular a absorção e o acúmulo de macro e micronutrientes no mutante *sex₁₋₄*.

6. CONCLUSÕES

O Se promoveu uma significativa redução no crescimento das plantas de *Arabidopsis thaliana* do tipo selvagem (Col-0) e no mutante *sex₁₋₄*. Entretanto, os efeitos inibitórios no crescimento não foram observados nas plantas do mutante *pgm* expostas ao Se. A utilização menos eficiente dos níveis de carbono das plantas de *Arabidopsis Col-0* tratadas com Se influenciou diretamente o seu crescimento. Isto desempenhou um papel importante ao possibilitar uma menor taxa de crescimento das plantas com muito pouca alteração no acúmulo de macro e micronutriente nos tecidos das plantas do tipo selvagem. Uma questão importante é compreender como os níveis de Se são detectados nas plantas do mutante *pgm*, com reduzida biossíntese de amido, e como a estreita coordenação do crescimento e do metabolismo mineral é alcançada em plantas *pgm* cultivadas com Se. Ademais, os menores acúmulos de macro e micronutrientes foram acompanhados de uma redução no crescimento das plantas *sex₁₋₄* cultivadas com Se. Assim, um desbalanço entre o metabolismo mineral e o crescimento parece ocorrer nas plantas com redução na degradação de amido. Em conjunto, as informações obtidas oferecem uma melhor compreensão dos mecanismos fisiológicos e metabólicos associados ao Se em plantas. Contudo, estudos em nível molecular tornam-se necessários para uma melhor compreensão do efeito do Se sobre o metabolismo das plantas.

7. REFERÊNCIAS

- Araújo WL, Tohge T, Ishizaki K, Leaver CJ, Fernie AR** (2011) Protein degradation - an alternative respiratory substrate for stressed plants. *Trends Plant Sci* **16**: 489-498
- Arnon DI** (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* **24**: 1-15
- Baker NR** (2008) Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 89-113

- Barillas JRV, Quinn CF, Pilon-Smits EAH** (2011) Selenium accumulation in plants-phytotechnological applications and ecological implications. *Inter J Phytoremediat* **13**:166-178
- Barrs HD, Weatherley PE** (1962) A re-examination of relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Aust J Biol Sci* **15**: 413-428
- Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis KR, Gorlach J** (2001) Growth Stage -Based Phenotypic Analysis of Arabidopsis: A Model for High Throughput Functional Genomics in Plants. *Plant Cell* **13**:1499-1510
- Bradford MM** (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
- Brown TA, Shrift A** (1981) Exclusion of selenium from proteins of selenium-tolerant astragalus species. *Plant Physiol* **67**: 1051-1053
- Burk RF** (2002) Selenium, an antioxidant nutrient. *Nutr Clin Care* **5**: 75-79
- Charlton AJ, Donarski JA, Harrison M, Jones SA, Godward J, Oehlschlager S, Arques JL, Ambrose M, Chinoy C, Mullineaux PM, Domoney C** (2008) Responses of the pea (*Pisum sativum* L.) leaf metabolome to drought stress assessed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Metabolomics* **4**: 312-327
- Cross JM, Korff Mv, Altmann T, Bartzetko L, Sulpice R, Gibon Y, Palacios N, Stitt M** (2006) Variation of enzyme activities and metabolite levels in 24 Arabidopsis accessions growing in carbon-limited conditions. **142**: 1574-1588
- Djanaguiraman M, Prasad PV, Seppanen M** (2010) Selenium protects sorghum leaves from oxidative damage under high temperature stress by enhancing antioxidant defense system. *Plant Physiol Biochem* **48**: 999-1007
- Eustice DC, Kull FJ, Shrift A** (1981) In Vitro incorporation of selenomethionine into protein by Astragalus polysomes 1. *Plant Physiol* **67**: 1059-1060
- Feng RW, Wei CY, Tu SX, Wu FC** (2009) Effects of Se on the uptake of essential elements in *Pteris vittata* L. *Plant Soil* **325**: 123-132
- Fernie AR, Aharoni A, Willmitzer L, Stitt M, Tohge T, Kopka J, Carroll AJ, Saito K, Fraser PD, DeLuca V** (2011) Recommendations for reporting metabolite data. *Plant Cell***23**:2477-2482
- Forsthoefel NR, Cushman MA, Cushman JC** (1995) Posttranscriptional and posttranslational control of enolase expression in the facultative Crassulacean acid metabolism plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Physiol* **108**: 1185-1195

- Freeman JL, Quinn CF, Marcus MA, Fakra S, Pilon-Smits EA** (2006) Selenium-tolerant diamondback moth disarms hyperaccumulator plant defense. *Curr Biol* **16**: 2181-2192
- Garcia-Barrera T, Gomez-Ariza JL, Gonzalez-Fernandez M, Moreno F, Garcia-Sevillano MA, Gomez-Jacinto V** (2012) Biological responses related to agonistic, antagonistic and synergistic interactions of chemical species. *Anal Bioanal Chem* **403**: 2237-2253
- Geigenberger P, Lerchi J, Stitt M, Sonnewald U** (1996) Phloem-specific expression of pyrophosphatase inhibits long distance transport of carbohydrates and amino acids in tobacco plants. *Plant Cell Environ***19**: 43-55
- Ghosh S, Saha J, Biswas AK** (2013) Interactive influence of arsenate and selante on growth and nitrogen metabolism in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Acta Physiol Plant* **35**: 1873-1885
- Gibon Y, Blaesing OE, Hannemann J, Carillo P, Hohne M, Hendriks JH, Palacios N, Cross J, Selbig J, Stitt M** (2004) A robot-based platform to measure multiple enzyme activities in Arabidopsis using a set of cycling assays: comparison of changes of enzyme activities and transcript levels during diurnal cycles and in prolonged darkness. *Plant Cell* **16**: 3304-3325
- Gibon Y, Vigeolas H, Tiessen A, Geigenberger P, Stitt M** (2002) Sensitive and high throughput metabolite assays for inorganic pyrophosphate, ADPGlc, nucleotide phosphates, and glycolytic intermediates based on a novel enzymic cycling system. *Plant J* **30**: 221-235
- Govasmark E, Singh BR, MacLeod JA, Grimmett MG** (2008) Selenium concentration in spring wheat and leaching water as influenced by application times of selenium and nitrogen. *J Plant Nut***31**: 193-203
- Guerrero B, Llugany M, Palacios O, Valiente M** (2014) Dual effects of different selenium species on wheat. *Plant Physiol Biochem* **83**: 300-307
- Haake V, Zrenner R, Sonnewald U, Stitt M** (1998) A moderate decrease of plastid aldolase activity inhibits photosynthesis, alters the levels of sugars and starch, and inhibits growth of potato plants. *Plant J* **14**: 147-157
- Habibi G** (2013) Effect of drought stress and selenium spraying on photosynthesis and antioxidante activity of spring barley. *Acta Agric Slov***101**: 31-39

- Hajiboland R, Amjad L** (2007) Does antioxidant capacity of leaves play a role in growth response to selenium at different sulfur nutritional status? *Plant Soil Environ* **53**: 207-215
- Hanson B, Garifullina GF, Lindblom SD, Wangeline A, Ackley A, Kramer K, Norton AP, Lawrence CB, Pilon-Smits EAH** (2014) Selenium accumulation protects *Brassica juncea* from invertebrate herbivory and fungal infection. *New Phytol* **159**: 461-469
- Hartikainen H, Xue TL, Piironen V** (2000) Selenium as an anti-oxidant and pro-oxidant in ryegrass. *Plant Soil* **225**: 193-200
- Hasanuzzaman M, Fujita M** (2011) Selenium pretreatment upregulates the antioxidant defense and methylglyoxal detoxification system and confers enhanced tolerance to drought stress in rapeseed seedlings. *Biol Trace Elem Res* **143**: 1758-1776
- Hendriks JH, Kolbe A, Gibon Y, Stitt M, Geigenberger P** (2003) ADP-Glucose Pyrophosphorylase Is Activated by Posttranslational Redox-Modification in Response to Light and to Sugars in Leaves of *Arabidopsis* and Other Plant Species. *Plant Physiol* **133**: 838-849
- Hunt R, Causton DR, Shipley B, Askew AP** (2002) A modern tool for classical plant growth analysis. *Ann Bot* **90**: 485-488
- Ito H, Iwabuchi M, Ogawa K** (2003) The sugar-metabolic enzymes aldolase and triose-phosphate isomerase are targets of glutathionylation in *Arabidopsis thaliana*: detection using biotinylated glutathione. *Plant Cell Physiol* **44**: 655-660
- Jenner HL, Winning BM, Millar AH, Tomlinson KL, Leaver CJ, Hill SA** (2001) NAD malic enzyme and the control of carbohydrate metabolism in potato tubers. *Plant Physiol* **126**: 1139-1149
- Kuznetsov VV, Kholodova VP, Yagodin BA** (2003) Selenium regulates the water status of plants exposed to drought. *Dokl Biol Sci* **390**: 266-268
- Lehotai N, Kolbert Z, Peto A, Feigl G, Oerdoeg A, Kumar D, Tari I, Erdei L** (2012) Selenite-induced hormonal and signalling mechanisms during root growth of *Arabidopsis thaliana* L. *J Exp Bot* **63**: 5677-5687
- Li HF, McGrath SP, Zhao FJ** (2008) Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite. *New Phytol* **178**: 92-102
- Lin TP, Caspar T, Somerville CR, Preiss J** (1988) A Starch Deficient Mutant of *Arabidopsis thaliana* with Low ADPglucose Pyrophosphorylase Activity Lacks One of the Two Subunits of the Enzyme. *Plant Physiol* **88**: 1175-1181

- Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR** (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nat Protoc* **1**: 387-396
- Luedemann A, Strassburg K, Erban A, Kopka J** (2008) TagFinder for the quantitative analysis of gas chromatography--mass spectrometry (GC-MS)-based metabolite profiling experiments. *Bioinformatics* **24**: 732-737
- Miller ER, Lei X, Ullrey DE** (1991) Trace elements in animal nutrition. In: Mortvedt JJ, Cox FR, Schuman LM, Welch RM (eds) *Micronutrients in agriculture*. N4, Book series, Madson. Soil Science Society of America. p 593-662
- Mori H** (2000) Direct determination of nitrate using nitrate reductase in a flow system. *J Health Sci* **46**: 385-388
- Munoz-Bertomeu J, Cascales-Minana B, Mulet JM, Baroja-Fernandez E, Pozueta-Romero J, Kuhn JM, Segura J, Ros R** (2009) Plastidial glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase deficiency leads to altered root development and affects the sugar and amino acid balance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **151**: 541-558
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. *Physiol Plant* **15**: 473-497
- Neuhierl B, Bock A** (1996) On the mechanism of selenium tolerance in selenium-accumulating plants. Purification and characterization of a specific selenocysteine methyltransferase from cultured cells of *Astragalus bisculatus*. *Eur J Biochem* **239**: 235-238
- Neuhierl B, Thanbichler M, Lottspeich F, Bock A** (1999) A family of S-methylmethionine-dependent thiol/selenol methyltransferases. Role in selenium tolerance and evolutionary relation. *J Biol Chem* **274**: 5407-5414
- Obata T, Fernie AR** (2012) The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. *Cell Mol Life Sci* **69**: 3225-3243
- Oh SA, Lee SY, Chung IK, Lee CH, Nam HG** (1996) A senescence-associated gene of *Arabidopsis thaliana* is distinctively regulated during natural and artificially induced leaf senescence. *Plant Mol Biol* **30**: 739-754
- Pantin F, Simonneau T, Rolland G, Dausat M, Muller B** (2011) Control of leaf expansion: A developmental switch from metabolics to hydraulics. *Plant Physiol* **156**: 803-815
- Pennanen A, Xue T, Hartikainen H** (2002) Protective role of selenium in plant subjected to severe UV irradiation stress. *J Appl Bot* **76**: 66-73

- Periappuram C, Steinhauer L, Barton DL, Taylor DC, Chatson B, Zou J** (2000) The plastidic phosphoglucomutase from Arabidopsis. A reversible enzyme reaction with an important role in metabolic control. *Plant Physiol* **122**: 1193-1199
- Pilon-Smits EA, LeDuc DL** (2009) Phytoremediation of selenium using transgenic plants. *Curr Opin Biotechnol* **20**: 207-212
- Pilon-Smits EAH, Quin CF** (2010) Selenium metabolism in plants. *Cell biology of metals and nutrients* **17**: 225-241
- Pittman JK** (2005) Managing the manganese: molecular mechanisms of manganese transport and homeostasis. *New Phytol* **167**: 733-742
- Praxedes SC, DaMatta FM, Loureiro ME, Ferrão MAG, Cordeiro AT** (2006) Effects of long-term soil drought on photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre var. kouillou) leaves. *Environ Exp Bot* **56**: 263–273
- Quinn CF, Freeman JL, Reynolds RJ, Cappa JJ, Fakra SC, Marcus MA, Lindblom SD, Quinn EK, Bennett LE, Pilon-Smits EA** (2010) Selenium hyperaccumulation offers protection from cell disruptor herbivores. *BMC Ecol* **10**: 19
- Ramagli LS, Rodriguez LV** (2014) Quantitation of microgram amounts of protein in twodimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer. *Electrophoresis* **6**: 559-563
- Ramos SJ, Faquin V, Guilherme LRG, Castro EM, Avila FW, Carvalho GS, Bastos CEA, Oliveira C** (2010) Selenium biofortification and antioxidant activity in lettuce plants fed with selenate and selenite. *Plant Soil Environ* **56**: 584-588
- Rios JJ, Rosales MA, Blasco B, Cervilla LM, Romero L, Ruiz JM** (2008) Biofortification of Se and induction of the antioxidant capacity in lettuce plants. *Sci Hortic* **116**: 248-255
- Ritte G, Heydenreich M, Mahlow S, Haebel S, Koetting O, Steup M** (2006) Phosphorylation of C6- and C3-positions of glucosyl residues in starch is catalysed by distinct dikinases. *Febs Lett* **580**: 4872-4876
- Salt DE, Blaylock M, Kumar NP, Dushenkov V, Ensley BD, Chet I, Raskin I** (1995) Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnology* **13**: 468-474
- Schippers JH, Nunes-Nesi A, Apetrei R, Hille J, Fernie AR, Dijkwel PP** (2008) The Arabidopsis onset of leaf death5 mutation of quinolinate synthase affects Nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis and causes early ageing. *Plant Cell* **20**: 2909-2925

- Seppänen M, Turakainen M, Hartikainen H** (2003) Selenium effects on oxidative stress in potato. *Plant Sci* **165**: 311–319
- Smrkolj P, Stibilj V** (2004) Determination of selenium in vegetables by hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *Anal Chim Acta* **512**: 11–17
- Sors TG, Ellis DR, Salt DE** (2005) Selenium uptake, translocation, assimilation and metabolic fate in plants. *Photosynth Res* **86**: 373-389
- Stadtman TC** (1990) Selenium Biochemistry. *Annu Rev Biochem* **59**: 111-127
- Stadtman TC** (1996) Selenocysteine. *Annu Rev Biochem* **65**: 83-100
- Stitt M, Lunn J, Usadel B** (2010) Arabidopsis and primary photosynthetic metabolism – more than the icing on the cake. *Plant J* **61**: 1067-1091
- Sulpice R, Pyl ET, Ishihara H, Trenkamp S, Steinfath M, Witucka-Wall H, Gibon Y, Usadel B, Poree F, Piques MC, Von Korff M, Steinhauser MC, Keurentjes JJB, Guenther M, Hoehne M, Selbig J, Fernie AR, Altmann T, Stitt M** (2009) Starch as a major integrator in the regulation of plant growth. *Proc Natl Acad Sci* **106**: 10348-10353
- Sulpice R, Tschoep H, M VONK, Bussis D, Usadel B, Hohne M, Witucka-Wall H, Altmann T, Stitt M, Gibon Y** (2007) Description and applications of a rapid and sensitive non-radioactive microplate-based assay for maximum and initial activity of D-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Plant Cell Environ* **30**: 1163-1175
- Terry N, Zayed AM, de Souza MP, Tarun AS** (2000) Selenium in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **51**: 401-432
- Turakainen M, Hartikainen H, Ekholm P, Seppanen MM** (2006) Distribution of selenium in different biochemical fractions and raw darkening degree of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers supplemented with selenate. *J Agric Food Chem* **54**: 8617-8622
- Valdez Barillas JR, Quinn CF, Pilon-Smits EA** (2011) Selenium accumulation in plants-phytotechnological applications and ecological implications. *Int J Phytoremediation* **13 Suppl 1**: 166-178
- White PJ, Bowen HC, Marshall B, Broadley MR** (2007) Extraordinarily high leaf selenium to sulfur ratios define 'Se-accumulator' plants. *Ann Bot* **100**: 111-118
- White PJ, Broadley MR** (2009) Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets-iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytol* **182**: 49-84

- Wiese A, Christ MM, Virnich O, Schurr U, Walter A** (2007) Spatio-temporal leaf growth patterns of *Arabidopsis thaliana* and evidence for sugar control of the diel leaf growth cycle. *New Phytol* **174**: 752-761
- Winkel LH, Johnson CA, Lenz M, Grundl T, Leupin OX, Amini M, Charlet L** (2012) Environmental selenium research: from microscopic processes to global understanding. *Environ Sci Technol* **46**: 571-579
- Zhang Y, Romero H, Salinas G, Gladyshev VN** (2006) Dynamic evolution of selenocysteine utilization in bacteria: a balance between selenoprotein loss and evolution of selenocysteine from redox active cysteine residues. *Genome Biol* **7**: R94