



PAULO FERNANDES BOLDRIN

**Variação genotípica no acúmulo e expressão de
genes relacionados à assimilação de selênio em
cultivares de trigo**

**LAVRAS – MG
2015**

PAULO FERNANDES BOLDRIN

**Varição genotípica no acúmulo e expressão de genes relacionados à
assimilação de selênio em cultivares de trigo**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, área de concentração em Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador
Dr. Valdemar Faquin

**LAVRAS – MG
2015**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados
pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Boldrin, Paulo Fernandes.

Varição genotípica no acúmulo e expressão de genes
relacionados à assimilação de selênio em cultivares de trigo / Paulo
Fernandes Boldrin. – Lavras : UFLA, 2015.

94 p.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador: Valdemar Faquin.

Bibliografia.

1. Selenato. 2. Selenito. 3. Biofortificação. 4. *Triticum aestivum*.
5. qRT-PCR. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

PAULO FERNANDES BOLDRIN

**Varição genotípica no acúmulo e expressão de genes relacionados à
assimilação de selênio em cultivares de trigo**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, área de concentração em Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 06 de julho de 2015.

Dr. Milton Ferreira de Moraes	UFMT
Dra. Joelma Pereira	UFLA
Dr. Luciano Vilela Paiva	UFLA
Dra. Maria Lígia de Souza Silva	UFLA

Dr. Valdemar Faquin
Orientador

**LAVRAS – MG
2015**

*Aos meus pais,
José Boldrin e Marli.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Ciência do Solo (DCS) / UFLA.

Ao Professor Valdemar Faquin, por sua franqueza, conselhos, orientações. Parte de minha formação profissional atribuo a seus ensinamentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo do doutorado regular e doutorado sanduíche no exterior.

À Professora e pesquisadora Li Li (Cornell University, USDA), por sua orientação e ensinamentos durante o doutorado sanduíche no exterior.

Ao Sílvio Júnio Ramos, por sempre ter me ajudado com ideias, conselhos e pela grande contribuição à minha formação profissional desde meu ingresso na iniciação científica.

Ao Professor Beбето, por sua ajuda e coorientação.

Aos técnicos e funcionários do DCS/UFLA, especialmente a Dirce, Roberto, João Gualberto e Geila Carvalho por sempre terem me ajudado.

Ao Fabrício Ávila, Nilma Portela, Ana Paula Corguinha, Guilherme Amaral, Rômulo Duarte por toda ajuda e pelo ótimo convívio que tivemos.

A todos os colegas do departamento.

Aos amigos Gustavo Oliveira e Thaís Andrade, pela sincera amizade e por toda ajuda.

Aos meus Pais e familiares, por todos os ensinamentos e virtudes.

Aos pais de minha esposa, Eduardo e Marly, que sempre me apoiaram e me deram suporte.

À minha esposa Karina, por sempre ter me apoiado com amor e companheirismo.

RESUMO

O selênio (Se) é considerado essencial para humanos e animais por ser componente da glutatona peroxidase e de outras selenoproteínas. Em plantas, o elemento não é considerado essencial, porém em baixas concentrações pode apresentar efeitos benéficos. Foram realizados dois estudos com diferentes materiais genéticos de trigo. No primeiro, objetivou-se avaliar o efeito da aplicação de selenato na biofortificação, nutrição em macros e micronutrientes e a expressão de alguns genes envolvidos na absorção e assimilação de Se. No segundo, buscou-se avançar o conhecimento na biofortificação com Se sob influência de selenato e selenito, além de avaliar como a utilização de Se influencia a nutrição de S nesta cultura. Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação em vasos contendo solução nutritiva. Utilizou-se delineamentos experimentais inteiramente casualizados. O primeiro estudo foi realizado em esquema fatorial 12 x 2, sendo doze genótipos de trigo e ausência e presença ($13 \mu\text{mol L}^{-1}$) de Se na solução, com três repetições. No segundo estudo, foram realizados três experimentos: “seedling” – esquema fatorial 7 x 2 x 4 com adicional, sete cultivares, duas fontes de Se (selenato e selenito) e quatro concentrações (0, 1, 5 e 10 μM) com adicional de 20 μM de selenato, com quatro repetições; “produção de sementes” – esquema fatorial 3 x 2, três cultivares e ausência e presença (5 μM de selenato), com quatro repetições e o experimento sobre cinética de absorção de S. No primeiro estudo, a produção e crescimento das cultivares não foram alterados. Os teores e acúmulo de Se nos grãos apresentaram diferença para os materiais genéticos avaliados. Oito cultivares na parte aérea e cinco nos grãos aumentaram os teores de S com a aplicação de selenato. A expressão dos genes avaliados não permite identificar um padrão de comportamento dos genótipos avaliados. No segundo estudo, as diferentes concentrações e formas de Se exercem efeitos divergentes no crescimento das plantas e teor de minerais na parte aérea e raízes nas cultivares de trigo. Ambos, selenato e selenito aumentaram a produção de matéria seca de raízes e parte aérea em baixa concentração (5 μM). O aumento da concentração do selenato até 10 μM não só aumentou o teor de Se, como também o teor de S na parte aérea para todas as cultivares avaliadas. Os resultados da cinética de absorção não explicaram como baixas concentrações de selenato aumentaram o teor de S na parte aérea. O aumento do teor de S sob influência de selenato parece ser uma combinação da expressão de *SULTR1;1* e *SULTR1;3* nas raízes, levando a uma melhor capacidade de absorção, uma baixa expressão de *SULTR4;1*, que limita o efluxo de sulfato nos vacúolos e uma baixa expressão de *APSI* e *APR2* nas folhas, que diminui a assimilação de S.

Palavras-chave: Selenato. Selenito. *Triticum aestivum*. Biofortificação. qRT-PCR.

ABSTRACT

Selenium (Se) is considered essential for plants and animals because is glutathione peroxidase's component and others selenoproteins. In plants, this element is not considered essential, but low doses can promote benefic effects. In this sense, it was realized two studies with different wheat genetic materials. In the first, the aim was to evaluate the effect of selenate to the biofortification, nutrition with macro and micronutrients and the expression of some genes involved in Se uptake and assimilation. In the second study, the aim was to advance the knowledge of Se biofortification by influence of selenate and selenite, in addition to evaluate how the Se application influences the nutrition with sulfur (S) in wheat plants. The experiments were conducted in pots with nutrient solution. The plants were arranged in a completely randomized design. The first study was installed in a factorial design 12 x 2, with twelve genotypes of wheat and presence ($13 \mu\text{mol L}^{-1}$) or absence of selenium in the solution, with three replicates. In the second study, were realized three experiments: "seedling" – factorial design 7 x 2 x 4 with additional, seven cultivars, two sources of Se (selenate and selenite) and four doses of Se (0, 1, 5 and 10 μM) with additional of 20 μM of selenate, with four replicates; "seed production" – factorial design 3 x 2, three cultivars and presence (5 μM of selenate) or absence, with four replicates and the experiment about absorption kinetics of S. In the first study, the production and growth of genotypes were not affected by Se application. The Se concentration and content in the grains showed difference to the genetic materials evaluated. Eight genotypes in the shoot and five in the grains increased S concentration with selenate application. The genes expression doesn't permit identify a standard of behavior of genotypes evaluated. In the second study, the different Se concentrations and forms promoted divergent effects for the plant growth and mineral concentrations in the shoots and roots for wheat plants. Both selenite and selenite increased the dry matter production of roots and shoots by low dosage (5 μM). The increasing concentrations of selenate supply to 10 μM not only continuously increased Se content, but also raised S level in shoots. The stimulation of S content by selenate in wheat shoots appeared to be due to a combination of a selenate-promoted expression of *SULTR1;1* and *SULTR1;3* with enhanced capacity of uptake, a reduced expression of *SULTR4;1* to limit efflux of sulfate from the vacuoles, and a reduced expression of *APS1* and *APR2* to decrease S assimilation.

Keywords: Selenate. Selenite. *Triticum aestivum*. Biofortification. qRT-PCR.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO 9
2	REFERENCIAL TEÓRICO 10
2.1	Cultura do trigo 10
2.2	Características do Selênio 12
2.3	Selênio na nutrição humana e animal 13
2.4	Uso do selênio na agricultura e seus efeitos em plantas 15
	REFERÊNCIAS 18
SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	
	ARTIGO 1: Variação genotípica e biofortificação com Se em cultivares de trigo em resposta à aplicação de selenato 23
	ARTIGO 2: Selenium-induced plant growth and sulfur accumulation in wheat plants 54

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O selênio (Se) é considerado um elemento mineral essencial para animais e humanos (BROADLEY et al., 2010), estando associado a diversos processos biológicos, como crescimento, fertilidade e determinadas doenças crônicas. No entanto, não é considerado um elemento essencial para os vegetais. Em baixas concentrações é considerado um elemento benéfico, atuando como antioxidante, proteção contra raios UV, regulador de crescimento e proteção contra patógenos, e em altas concentrações atua como um elemento tóxico, no qual a planta apresenta sintomas de baixo crescimento, clorose, inibição da síntese proteica e morte precoce (KAUR et al., 2014). De modo geral, quando a concentração do Se nas plantas é maior que 1 mg kg^{-1} , pode apresentar efeitos tóxicos; abaixo desse valor, exerce seu efeito benéfico nas plantas (MALIK et al., 2011; XUE; HARTIKAINEN; PIIRONEN, 2001).

Devido ao crescente interesse pela saúde alimentar, o Se tem sido a pauta de muitas discussões, incluindo os diferentes aspectos do elemento no ambiente, na saúde humana e animal, e no uso na agricultura.

O United States Department of Agriculture (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2003) recomenda a ingestão diária de Se de 50 a 70 μg por pessoa. Porém, estudos revelam que a dieta da maioria da população mundial está deficiente no elemento (COMBS, 2001), o que implica na ocorrência de diversas doenças associadas à falta do Se no metabolismo humano. Visando a contornar essa deficiência, a estratégia da biofortificação com Se é proposta para aumentar os teores do elemento nas culturas agrícolas, a fim de proporcionar maior teor de Se na dieta humana e animal, satisfazendo os níveis ideais de consumo e reduzindo as consequências da baixa ingestão do nutriente.

A baixa disponibilidade de Se na maioria dos solos, principalmente os intemperizados, é um fator que justifica o uso da biofortificação. Culturas agrícolas que crescem em solos com baixa disponibilidade do elemento, tendem a acumulá-lo em baixas concentrações. Além disso, a capacidade em absorver e acumular Se varia com as espécies, estágio de crescimento e fatores relacionados à forma do elemento disponível na solução do solo. Selenato e selenito são as formas inorgânicas de Se, solúveis em água, e representam as formas mais biodisponíveis do elemento para as plantas na natureza (DUNGAN; FRANKENBERGER, 1999).

O uso de alimentos amplamente consumidos pela população mundial é uma estratégia importante a ser aplicada em programas de biofortificação. Nesse sentido, o trigo, o segundo cereal mais consumido e o terceiro mais produzido no mundo (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2013), é considerado uma cultura agrícola potencial para introdução do Se na alimentação humana. Apesar de não ser considerada uma planta acumuladora de Se, estudos revelam o sucesso da cultura na prática da biofortificação (CUBADDA et al., 2010; LYONS; STANGOULIS; GRAHAM, 2003).

Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar a influência do Se na nutrição em macros e micronutrientes, a expressão de alguns genes envolvidos na absorção e assimilação de Se, avançar o conhecimento na biofortificação com Se sob influência de selenato e selenito em cultivares de trigo, além de avaliar como a utilização de Se influencia a nutrição de S nesta cultura.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cultura do Trigo

O trigo é uma gramínea do gênero *Triticum*, amplamente cultivada e consumida no mundo todo (PENG; SUN; NEVO, 2011). É o terceiro cereal mais produzido no mundo, depois do arroz e do milho (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2013). União Europeia, China, Índia e Estados Unidos são os maiores produtores de trigo, e o Brasil ocupou a 15ª posição na produção mundial do cereal na safra 2013/2014 (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 2003).

O cereal é produzido no Brasil em três principais regiões: Sudeste, Centro-oeste e Sul, sendo a região Sul do país a responsável por 95% da produção de trigo (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2014).

De acordo com dados da FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2013), 65% da produção de trigo são destinados ao consumo humano, 17% à alimentação animal, 12% são processados pela indústria, especialmente na forma de biocombustíveis, e o restante da produção é desperdiçada.

Programas de melhoramento de trigo têm contribuído para o sucesso da cultura. A adaptabilidade das plantas e o alto rendimento da cultura, aliado às propriedades únicas de panificação a partir da farinha do trigo, são características que proporcionaram grande aceitação do cereal pelos produtores e consumidores (SHEWRY, 2009).

Em termos de consumo humano de cereais, o arroz, o trigo e o milho, nessa sequência, são os mais consumidos, sendo o milho, em grande parte, destinado à alimentação animal (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2013).

Devido à ampla variedade de produtos provenientes da farinha de trigo, como pães, bolos, biscoitos, massas e macarrão, entre outros, o trigo é muito

consumido pela população mundial, e participa em 30% dos carboidratos presentes na dieta humana (SHEWRY, 2009; WELCH et al., 2005).

Dessa forma, o trigo é considerado uma espécie vegetal com grande potencial de utilização em programas de biofortificação. Apesar de não ser considerada uma planta acumuladora de Se, sua biofortificação com Se tem sido realizada com sucesso (CUBADDA et al., 2010; LYONS; STANGOULIS; GRAHAM, 2003). A forma de Se predominante nos grãos de trigo é a selenometionina, a qual varia de 53 a 83% (WHANGER, 2002). Outras formas de Se podem estar presentes em menores proporções, como selenato (12-19%), selenocisteína (4-12%), seleno-metilselenocisteína (1-4%), dentre outras em menores quantidades.

2.2 Características do Selênio

O Se é um elemento considerado essencial para os animais e humanos, uma vez que é componente da enzima glutathione peroxidase, a qual participa de processos antioxidantes nos metabolismos animal e humano (RAYMAN, 2000). O elemento foi descoberto em 1818, pelo químico Jons Jacob Berzelius durante a produção de ácido sulfúrico (KAUR et al., 2014).

Há várias formas de Se encontradas na natureza. Selenato (SeO_4^{2-}) e selenito (SeO_3^{2-}) são formas inorgânicas solúveis em água, e representam as formas com maior potencial de biodisponibilidade e bioacumulação no ambiente (DUNGAN; FRANKENBERGER, 1999). Os aminoácidos selenometionina e selenocisteína são compostos orgânicos de Se (WHITE et al., 2004), e as formas di-metil-seleneto, di-metil-diseleneto, dimethyl selenone, di-metil-selenosulfureto, e metano-selenol são as formas voláteis do elemento (KAUR et al., 2014).

A ocorrência de Se nos solos é principalmente determinada por fatores geológicos (HAWKESFORD; ZHAO, 2007). Solos provenientes de rochas

magmáticas geralmente possuem menores teores de Se quando comparados a solos originários de rochas sedimentares (MAYLAND et al., 1989). Além disso, condições de solo como pH, potencial redox, textura e ocorrência de óxidos e hidróxidos de ferro e alumínio, condições climáticas e vegetação de cobertura, também são fatores que influenciam a biodisponibilidade do Se para as plantas e determinam a ocorrência das formas do elemento no solo (GISSEL-NIELSEN et al., 1984; MIKKELSEN; HAGHNIA; PAGE, 1989; MCNEAL; BALISTRERI, 1989). Em condições de solo mais oxidado e alcalino, predomina a forma de selenato, enquanto em condições de solo com pH ácido a neutro, a forma predominante de Se é o selenito (HAWKESFORD; ZHAO, 2007). O selenito é mais fortemente adsorvido aos coloides superficiais do solo, como óxidos de ferro e alumínio, o que o torna, conseqüentemente, menos disponível para as plantas que o selenato, cuja tendência é ser adsorvido por forças eletrostáticas, mais fracas que as do selenito (BARROW; WHELAN, 1989). De modo geral, a biodisponibilidade de Se para as plantas diminui com a diminuição do pH do solo, e com o aumento dos teores de argila, óxidos/hidróxidos de ferro e alumínio e teor de matéria orgânica (GISSEL-NIELSEN et al., 1984; MIKKELSEN; HAGHNIA; PAGE, 1989). O regime pluvial também tem um papel importante na ocorrência de Se nos solos, no qual solos com alto teor de Se localizados em regiões cujo regime de chuvas é menor que 500 mm podem apresentar efeito tóxico do elemento, enquanto o mesmo tipo de solo com o mesmo teor de Se em regiões úmidas não é potencialmente tóxico para as plantas (FLEMING, 1980; KAUR et al., 2014).

2.3 Selênio na nutrição humana e animal

O Se está envolvido em importantes processos biológicos e é considerado um elemento fundamental para o crescimento normal, fertilidade e prevenção de doenças crônicas em humanos, como artrite, câncer, cirrose,

enfisema, arteriosclerose, entre outras, por atuar como elemento protetor (VIARO; VIARO; FLECK, 2001).

O consumo de Se está diretamente relacionado à prevenção de diversas doenças, tanto em humanos quanto em animais. Está comprovado que, em alguns animais, a doença conhecida como white-muscle (músculo-branco) está associada à deficiência de Se, principalmente em bezerros e cordeiros. De forma geral, as ovelhas e os cordeiros são os animais mais sensíveis à falta do elemento na nutrição (TAMÁS; MÁNDOKI; CSAPÓ, 2010). Em humanos, há evidências de que a deficiência de Se pode afetar a saúde de diversas formas, incluindo função imune, infecções virais, reprodução, especialmente a fertilidade masculina, funcionamento da tireoide, asma e inflamações diversas (RAYMAN, 2000; RAYMAN, 2002).

O consumo de Se varia de acordo com o tipo de alimentação, e com os teores de Se no solo em que os alimentos foram produzidos. Na China, na região de Keshan, o consumo de Se varia entre 7-11 μg por dia, enquanto em países europeus, o consumo médio da população é de 30-100 μg por dia, e na América do Norte varia de 60-220 μg por dia (COMBS, 2001). De acordo com o United States Department of Agriculture (2003), a necessidade humana de ingestão diária de Se é de 50-70 μg por pessoa, o que indica que, em muitos países, a ingestão de Se está abaixo da recomendada, o que pode acarretar em diversos efeitos da deficiência do elemento na saúde humana.

A deficiência de Se na saúde humana e animal pode ser contornada através da diversificação da dieta, suplementação alimentar, fortificação por indústria e pelo uso da biofortificação, técnica que consiste no aumento dos teores do elemento nas culturas agrícolas, pela sua introdução na adubação (biofortificação agrônômica) ou por melhoramento genético (biofortificação genética) (RIOS et al., 2008; WHITE; BROADLEY, 2009).

Segundo Hartikainen (2005), a utilização da biofortificação com Se em plantas permite inserir o elemento na cadeia alimentar, tendo as plantas como aliadas, no sentido de atuarem no controle da ingestão excessiva e, ou, acidental, susceptível em humanos que fazem uso de suplementos alimentares contendo Se.

2.4 Uso do selênio na agricultura e seus efeitos em plantas

O Se não é considerado essencial para os vegetais, apesar de haver ainda controvérsias sobre a sua essencialidade (TERRY et al., 2000). Estudos mostram o comportamento do elemento nas plantas, que varia desde a participação em compostos e reações no metabolismo de vegetais, até em efeitos benéficos, como aumento da produtividade em algumas culturas (HARTIKAINEN; XUE; PIIRONEN, 2000; RIOS et al., 2010).

As espécies vegetais diferem quanto à sua capacidade em acumular Se, e por isso, são divididas em três grupos: plantas não acumuladoras, selênio-indicadoras e plantas acumuladoras (DHILLON; DHILLON, 2003).

O Se pode ser absorvido pelas raízes das plantas em diferentes formas, como selenato (SeO_4^{2-}), selenito (SeO_3^{2-}), na forma de compostos orgânicos, como os aminoácidos selenometionina e selenocisteína e também através das formas voláteis do elemento como di-metil seleneto e di-metil di-seleneto (WHITE et al., 2004).

Conforme já citado, selenato e selenito são as formas de Se com maior potencial de bioacumulação e biodisponibilidade no ambiente, e conseqüentemente, são as formas mais absorvidas pelas raízes das plantas.

São esperadas amplas diferenças entre a absorção de selenato e selenito pelas plantas, já que existe uma diferença de afinidade entre eles por colóides do solo (ADRIANO, 1986). O selenito é mais fortemente adsorvido pelos argilominerais do solo e, portanto, está menos disponível para as plantas que o

selenato, considerando uma mesma concentração no solo (HOPPER; PARKER, 1999). Em condições naturais de solo intemperizado, o selenito está adsorvido a óxidos e hidróxidos de ferro, alumínio e manganês (BARROW; WHELAN, 1989), o que o torna potencialmente menos disponível para as plantas. O selenato é absorvido pelas raízes por transportadores do sulfato (BELL; PARKER; PAGE, 1992; TERRY et al., 2000). Já o selenito, não apresenta um modelo conciso para sua absorção pelas plantas, alguns trabalhos sugerem que o selenito é absorvido pelas raízes através da difusão passiva (ARVY, 1993; LI; MCGRATH; ZHAO, 2008).

Diferenças de mobilidade no interior das plantas também têm sido relatadas para o selenato e selenito. O selenato é transportado para a parte aérea muito mais facilmente do que o selenito (ZHANG et al., 2003). O menor transporte de selenito para a parte aérea está relacionado à sua conversão acelerada em formas orgânicas de Se, como selenometionina (ZAYED; LYTLE; TERRY, 1998), as quais são armazenadas nas raízes.

Tanto trabalhos de campo quanto em casa-de-vegetação, têm mostrado que a aplicação de selenato é mais eficiente que a aplicação de selenito para aumentar a concentração de Se em plantas (BOLDRIN et al., 2012; BOLDRIN et al., 2013; CARTERS; GIANFREDA; MORA, 2005; RAMOS et al., 2011). Excluindo-se as condições de solo e suas características, trabalhos em solução nutritiva também demonstram maior acúmulo de selenato em plantas quando comparado à aplicação de selenito (RAMOS et al., 2011).

O Se é metabolizado em plantas via rota de absorção e assimilação de S, devido às semelhanças das propriedades químicas entre S e Se, atribuída ao fato de pertencerem à mesma família da tabela periódica (calcogênios – VI A) (PILON-SMITS; QUINN, 2010).

Antes da assimilação a compostos orgânicos, o S, através da ação da enzima ATP sulfúrilase é convertido em 5'-adenililsulfato ou adenosina-5'-

fosfosulfato (APS). A APS, por sua vez, é reduzida pela APS redutase ou adenilil-sulfato redutase (APR) a sulfito (a APR transfere dois elétrons da glutathione peroxidase (GSH) para produzir o sulfito). A seguir a sulfito redutase transfere elétrons da ferredoxina (Fd_{red}) para produzir sulfeto (S^{2-}) e este por sua vez reage com O-acetilserina (OAS) para formar os compostos orgânicos cisteína e acetato (KOPRIVA, 2006; LEUSTEK et al., 2000).

De forma semelhante, o selenato (SeO_4^{2-}) é absorvido por transportadores de sulfato e através da ATP sulfúrilase é transformado em adenosina fosforoselenato (APSe). A APSe sob ação da enzima APR é convertido em selenito (SeO_3^{2-}), que em seguida é transformado em seleneto (Se^{2-}) através da sulfito redutase. Por sua vez, o Se^{2-} , sob ação da enzima OAS, é transformado em selenocisteína e este em outros compostos orgânicos como metilselenocisteína e proteínas.

Nesse sentido, é fato que ainda há muito que se avançar no entendimento do metabolismo do Se em plantas, bem como sua relação com os nutrientes, especialmente o S. Visando a contribuir com informações relevantes sobre o uso do Se em culturas agrícolas, este trabalho busca gerar novos conhecimentos e respaldar o uso do elemento na agricultura, a fim de garantir a entrada desse elemento na alimentação.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ADRIANO, D. C. **Trace elements in the terrestrial environment**. New York: Springer-Verlag, 1986. 867 p.

ARVY, M. P. Selenate and selenite uptake and translocation in bean plants (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 44, n. 6, p. 1083-1087, June 1993.

BARROW, N. J.; WHELAN, B. R. Testing a mechanistic model. 7. The effects of pH and of electrolyte on the reaction of selenite and selenate with a soil. **Journal of Soil Science**, Oxford, v. 40, n. 1, p. 17-28, Mar. 1989.

BELL, P. F.; PARKER, D. R.; PAGE, A. L. Contrasting selenate sulfate interactions in selenium-accumulating and nonaccumulating plant species. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 56, n. 1, p. 1818-1824, 1992.

BOLDRIN, P. F. et al. Selenato e selenito na produção e biofortificação agrônômica com selênio em arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 47, n. 6, p. 831-837, jun. 2012.

BOLDRIN, P. F. et al. Soil and foliar application of selenium in rice biofortification. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 31, n. 2, p. 238-244, Sept. 2013.

BROADLEY, M. R. et al. Selenium biofortification of high-yielding winter wheat (*Triticum aestivum* L.) by liquid or granular Se fertilisation. **Plant and Soil**, The Hague, v. 332, n. 1-2, p. 5-18, July 2010.

CARTES, P.; GIANFREDA, L.; MORA, M. L. Uptake of selenium and its antioxidant activity in ryegrass when applied as selenate and selenite forms. **Plant and Soil**, The Hague, v. 276, n. 1-2, p. 359-367, Oct. 2005.

COMBS, G. F. Selenium in global food systems. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 85, n. 5, p. 517-547, May 2001.

CUBADDA, F. et al. Changes in selenium speciation associated with increasing tissue concentrations of selenium in wheat grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, n. 4, p. 2295-2301, 2010.

DHILLON, K. S.; DHILLON, S. K. Quality of underground water and its contribution towards selenium enrichment of the soil–plant system for a seleniferous region of northwest India. **Journal of Hydrology**, Amsterdam, v. 272, n. 1-4, p. 120–130, Mar. 2003.

DUNGAN, R. S.; FRANKENBERGER, J. W. T. Microbial transformations of selenium and the bioremediation of seleniferous environments. **Bioremediation Journal**, Oxford, v. 3, n. 3, p. 171-188, 1999.

FLEMING, G. A. Essential micronutrients II: iodine and selenium. In: DAVIES, B. E. (Ed.). **Applied soil trace elements**. New York: John Wiley, 1980. p. 199–234.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAO statistical yearbook 2013**. Rome: FAO, 2013. 289 p. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/018/i3107e/i3107e00.htm>>. Acesso em: 24 abr. 2015.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **O estado da segurança alimentar e nutricional no Brasil: um retrato multidimensional**. Brasília: FAO, 2014. 89 p. Disponível em: <https://www.fao.org.br/download/SOFI_p.pdf>. Acesso em: 24 abr. 2015.

FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE. **Grain: world markets and trade**. [S.l.: s.n.], 2015. Disponível em: <apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/grain-wheat.pdf>. Acesso em: 19 abr. 2015.

GISSEL-NIELSEN, G. et al. Selenium in soils and plants and its importance in livestock and human nutrition. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 37, p. 397–460, 1984.

HARTIKAINEN, H. Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, Stuttgart, v. 18, n. 4, p. 309-318, June 2005.

HARTIKAINEN, H.; XUE, T. L.; PIIRONEN, V. Selenium as an antioxidant and pro-oxidant in ryegrass. **Plant and Soil**, The Hague, v. 225, n. 1, p. 193-200, Jan. 2000.

HAWKESFORD, M. J.; ZHAO, F. J. Strategies for increasing the selenium content of wheat **Journal of Cereal Science**, London, v. 46, n. 3, p. 282-292, Nov. 2007.

- HOPPER, J.; PARKER, D. Plant availability of selenite and selenate as influenced by the competing ions phosphate and sulfate. **Plant and Soil**, The Hague, v. 210, n. 1, p. 199-207, Feb. 1999.
- KAUR, N. et al. Selenium in agriculture: a nutrient or contaminant for crops? **Archives of Agronomy and Soil Science**, Easton, v. 60, n. 12, p. 1593–1624, Apr. 2014.
- KOPRIVA, S. Regulation of sulfate assimilation in Arabidopsis and beyond. **Annals of Botany**, Oxford, v. 97, n. 4, p. 479–495, Apr. 2006.
- LEUSTEK, T. et al. Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 51, p. 141–165, June 2000.
- LI, H.; MCGRATH, S.; ZHAO, F. Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite. **New Phytologist**, Cambridge, v. 178, n. 1, p. 92-102, Jan. 2008.
- LYONS, G.; STANGOULIS, J.; GRAHAM, R. High-selenium wheat: biofortification for better health. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 16, n. 1, p. 45-60, June 2003.
- MALIK, J. A. et al. Promotion of growth in mungbean (*Phaseolus aureus* Roxb.) by selenium is associated with stimulation of carbohydrate metabolism. **Biological Trace Element Research**, London, v. 143, n. 1, p. 530–539, Oct. 2011.
- MAYLAND, H. F. et al. Selenium in seleniferous environments. In: JACOBS, L. W. (Ed.). **Selenium in agriculture and the environment**. Madison: Soil Science Society of America and American, 1989. p. 199-224.
- MCNEAL, J. M.; BALISTRIERI, L. S. Geochemistry and occurrence of selenium: an overview. In: JACOBS, L. W. (Ed.). **Selenium in agriculture and the environment**. Madison: Soil Science Society of America, 1989. p. 15-50.
- MIKKELSEN, R. L.; HAGHNIA, G. H.; PAGE, A. L. Factors affecting selenium accumulation by crop plants. In: JACOBS, L. W. (Ed.). **Selenium in agriculture and the environment**. Madison: Soil Science Society of America, 1989. p. 65–93.

PENG, J.; SUN, D.; NEVO, E. Wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*, occupies a pivotal position in wheat domestication process. **Australian Journal of Crop Science**, Melbourne, v. 5, n. 9, p. 1127-1143, 2011.

PILON-SMITS, E.; QUINN, C. Selenium metabolism in plants. In: HELL, R.; MENDEL, R. R. (Ed.). **Cell biology of metal and nutrients**. Berlin: Springer, 2010. p. 225-241.

RAMOS, S. J. et al. Selenium accumulation in lettuce germplasm. **Planta**, Berlin, v. 233, n. 4, p. 649-660, Apr. 2011.

RAYMAN, M. P. The argument for increasing selenium intake. **Proceedings of the Nutrition Society**, Cambridge, v. 61, n. 2, p. 203-215, Apr. 2002.

RAYMAN, M. P. The importance of selenium to human health. **Lancet**, London, v. 356, n. 9225, p. 233-241, July 2000.

RÍOS, J. J. et al. Biofortification of se and induction of the antioxidant capacity in lettuce plants. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 116, n. 3, p. 248-255, May 2008.

RIOS, J. J. et al. Response of nitrogen metabolism in lettuce plants subjected to different doses and forms of selenium. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 90, n. 11, p. 1914-1919, Aug. 2010.

SHEWRY, P. R. Wheat. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 6, p. 1537-1553, 2009.

TAMÁS, M.; MÁNDOKI, Zs.; CSAPÓ, J. The role of selenium content of wheat in the human nutrition: a literature review. **Acta Universitatis Sapientiae**, Washington, v. 3, p. 5-34, 2010.

TERRY, N. et al. Selenium in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 51, p. 401-432, Sept. 2000.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Dietary reference intakes: elements**. Washington: [s.n.], 2003. Disponível em: <[http://www.ion.edu/Global/News %20Announcements/~media/48FAAA2FD9E74D95BBDA2236E7387B49.ash](http://www.ion.edu/Global/News%20Announcements/~media/48FAAA2FD9E74D95BBDA2236E7387B49.ash)>. Acesso em: 15 mar. 2015.

VIARO, R. S.; VIARO, M. S.; FLECK, J. Importância bioquímica do selênio para o organismo humano. **Disciplinarum Scientia**, Santa Maria, v. 2, n. 1, p. 17-21, 2001.

WELCH, R. M. et al. Potential for improving bioavailable zinc in wheat grain (*Triticum* species) through plant breeding. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 6, p. 2176-2180, Mar. 2005.

WHANGER, P. D. Selenocompounds in plants and animals and their biological significance. **Journal of the American College of Nutrition**, New York, v. 21, n. 3, p. 223-232, June 2002.

WHITE, P. J. et al. Interactions between selenium and sulphur nutrition in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 404, p. 1927-1937, Aug. 2004.

WHITE, P. J.; BROADLEY, M. R. Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets - iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. **New Phytologist**, London, v. 182, n. 1, p. 49-84, 2009.

XUE, T. L.; HARTIKAINEN, H.; PIIRONEN, V. Antioxidative and growth-promoting effect of selenium on senescing lettuce. **Plant and Soil**, The Hague, v. 237, n. 1, p. 55-61, Nov. 2001.

ZAYED, A.; LYTLE, C. M.; TERRY, N. Accumulation and volatilization of different chemical species of selenium by plants. **Planta**, Berlin, v. 206, n. 2, p. 284-292, Oct. 1998.

ZHANG, Y. et al. Uptake and transport of selenite and selenate by soybean seedlings of two genotypes. **Plant and Soil**, The Hague, v. 253, n. 2, p. 437-443, June 2003.

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

**Variação genotípica e biofortificação com Se em cultivares de trigo em
resposta à aplicação de selenato**

(Artigo elaborado segundo normas da revista Pesquisa Agropecuária
Brasileira – Versão preliminar)

Variação genotípica e biofortificação com Se em cultivares de trigo em resposta à aplicação de selenato

Paulo Fernandes Boldrin^a, Valdemar Faquin^a, Luiz Roberto Guimarães Guilherme^a, Aline da Consolação Sampaio Clemente^b, Thais de Andrade^b

^aDepartamento de Ciência do Solo, Universidade Federal de Lavras, Caixa postal: 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brasil

^bDepartamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, Caixa postal: 3037, CEP 37200-000, Lavras, MG, Brasil

RESUMO

O selênio (Se) é considerado essencial para humanos e animais por fazer parte da enzima glutathiona peroxidase. Apesar de não ser considerado essencial para as plantas, em baixas concentrações pode ser benéfico para o desenvolvimento e crescimento vegetal. Objetivou-se avaliar o efeito da aplicação de selenato na biofortificação, na nutrição em macros e micronutrientes e na expressão de genes envolvidos na absorção e assimilação de Se em doze genótipos de trigo. O experimento foi conduzido em casa de vegetação em vasos contendo solução nutritiva. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 12 x 2, sendo doze genótipos de trigo e ausência e presença (13 µmol) de Se na solução, com três repetições. No final do ciclo avaliaram-se dados de produção. As plantas foram colhidas e determinou-se a matéria seca em cada parte da planta. Determinaram-se os teores de macros e micronutrientes e os teores de Se nas plantas. Também foi avaliado com PCR quantitativo em tempo real, a expressão gênica de

alguns genes envolvidos na absorção e metabolismo de Se. A produção e crescimento das cultivares estudadas não foram alterados. Os teores e acúmulo de Se nos grãos apresentaram diferença para os diferentes materiais genéticos avaliados. Oito cultivares na parte aérea e cinco nos grãos aumentaram os teores de enxofre (S) com a aplicação de selenato. A expressão dos genes avaliados não permite identificar um padrão de comportamento das cultivares estudadas.

Palavras chaves: Selenato, *Triticum aestivum*, qRT-PCR

1. Introdução

O selênio (Se) é um elemento considerado essencial para os animais e humanos, uma vez que é componente da enzima glutathione peroxidase, a qual participa de processos antioxidantes nos metabolismos animal e humano (RAYMAN, 2002).

A ingestão de Se pelos humanos varia de acordo com o tipo de alimentação, e com os teores de Se no solo onde os alimentos são cultivados. Na China, na região de Keshan, o consumo de Se varia entre 7-11 µg por dia, enquanto em países europeus, o consumo médio da população é de 30-100 µg por dia, e na América do Norte varia de 60-220 µg por dia (COMBS, 2001). De acordo com o United States Department

of Agriculture (USDA, 2003), a necessidade humana de ingestão diária de Se é de 50-70 μg , o que indica que, em muitos países, a ingestão de Se está abaixo da recomendada, o que pode acarretar nos diversos efeitos da deficiência do elemento na saúde humana.

A deficiência de Se na saúde humana e animal pode ser contornada através da diversificação da dieta, suplementação alimentar, fortificação por indústrias e pelo uso da biofortificação com o Se. A biofortificação é uma técnica que consiste no aumento dos teores do elemento nas culturas agrícolas, pela sua introdução na adubação (biofortificação agrônômica) ou por melhoramento genético (biofortificação genética) (RIOS et al., 2008; WHITE; BROADLEY, 2009).

O trigo é considerado uma espécie com grande potencial de utilização em programas de biofortificação, já que é consumido por grande parte da população mundial. Apesar de não ser considerada uma planta acumuladora de Se, sua biofortificação com o elemento tem sido realizada com sucesso (LYONS; STANGOULIS; GRAHAM, 2003; CUBADDA et al., 2010).

Programas de melhoramento de trigo têm contribuído para o sucesso da cultura. A adaptabilidade das plantas e o alto rendimento da cultura, aliado às propriedades únicas de panificação a partir da farinha do trigo, são características que proporcionaram grande aceitação do cereal pelos produtores e consumidores (SHEWRY, 2009).

Desse modo, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da aplicação de selenato na biofortificação, na nutrição em macros e micronutrientes e na expressão de genes envolvidos na absorção e assimilação de Se em doze cultivares de trigo.

2. Material e métodos

2.1. Delineamento experimental, tratamentos e condução do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras, em solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) utilizando vasos de 3 litros.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 12 x 2, sendo doze genótipos de trigo e ausência e presença ($13 \mu\text{mol L}^{-1}$) de Se na solução, com três repetições. Cada unidade experimental consistiu de uma planta por vaso, totalizando 72

vasos. A fonte de Se utilizada foi Selenato de Sódio – Na_2SeO_4 (Sigma-Aldrich).

A escolha da concentração de selenato utilizada no experimento foi definida com base em trabalhos anteriores, com o objetivo de usar uma dosagem que fosse eficiente para a biofortificação com Se e que estivesse na faixa de concentração considerada benéfica para seu uso (Xue et al., 2001; Pilon-Smits et al., 2009)

Foram utilizados 11 cultivares de trigo: IAC 364, Pioneiro, Supera, Brilhante, BRS 207, BRS 210, BRS 264, CD 108, IAC 24, IAC 375, BRS 254 e 1 linhagem: VI 00225.

As sementes (oriundas do banco de germoplasma da UFLA e EPAMIG) de cada cultivar de trigo foram colocadas para germinar em bandejas de poliestireno expandido com 128 células, contendo vermiculita como substrato e irrigadas com água deionizada. Cinco dias após a emergência as plântulas foram transferidas para solução de adaptação em bandejas de 30L contendo $\frac{1}{4}$ da força iônica da solução de Hoagland, na qual foram mantidas por sete dias. Posteriormente, foram transferidas para uma solução com $\frac{1}{2}$ da força iônica por mais sete dias. Depois desse período, o experimento foi instalado em 100% da força

iônica da solução e foram aplicados os tratamentos com e sem Se na solução.

Durante todo o período experimental, a solução nutritiva foi mantida sob aeração constante e trocada semanalmente. O pH da solução foi ajustado diariamente para $6,0 \pm 0,2$ pela correção com NaOH ou HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

No final do ciclo, foram avaliadas a altura das plantas, número de espigas por planta, número de espiguetas por espiga, número de grãos por espiguetas e peso de 1000 grãos. As plantas colhidas foram separadas em parte aérea, raízes e grãos, lavadas em água deionizada e colocadas para secar separadamente em estufa de circulação forçada de ar a 65°C por 72 horas, quando quantificou-se a massa seca de cada parte.

2.2. Análises químicas dos tecidos

O material vegetal seco em estufa foi moído em moinho tipo Wiley e submetido à digestão nítrico-perclórica seguindo a metodologia descrita por Malavolta et al. (1997). No extrato, os teores totais de Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn das amostras foram determinadas usando espectrofotômetro de absorção atômica (PerkinElmer Inc., San Jose, CA,

EUA). O P e S foram determinados utilizando espectrofotômetro colorimétrico (Digimed, modelo DM-62) e o K foi em fotômetro de chama (Micronal, modelo B582, São Paulo, SP, Brasil). O teor de N foi determinado por titulometria através do método de Kjeldahl, após digestão em ácido sulfúrico (Malavolta et al., 1997).

Para a determinação dos teores de Se nas raízes, na parte aérea e nos grãos de cada amostra, utilizou extração com HNO₃ concentrado (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em forno de microondas CEM (Mars modelo 5, CEM Corporation, Matthews, NC, EUA). A quantificação de Se nos extratos foi realizada por espectrometria de absorção atômica (GFAAS, Perkin-Elmer® AAnalyst™800 – Waltham, MA, USA) segundo metodologia descrita por Ramos et al. (2012). O valor do limite de detecção do método foi de 18 µg kg⁻¹.

Para avaliar a acurácia das análises de Se, foi utilizado material certificado White Clover (BCR402, Institute for Reference Materials and Measurements, Geel, Bélgica), o qual, juntamente com o branco, foi incluído em cada bateria de digestão, a recuperação do padrão utilizado nas leituras foi de 70%.

Os teores de Se foram relacionados à massa seca produzida para determinação do acúmulo de Se em cada parte da planta, para cada tratamento. Com esses dados, estimaram-se os seguintes índices:

- Eficiência das Raízes na Absorção de Se = (mg de Se total acumulado na planta / g massa seca de raízes);

- Índice de translocação do Se = [(acúmulo de Se na parte aérea + acúmulo de Se nos grãos) / (Se total acumulado na planta) x 100].

2.3. Extração de RNA, transcrição reversa e PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

Para a avaliação da expressão de alguns genes envolvidos na absorção e assimilação de Se, foram escolhidas seis cultivares para as análises de qRT-PCR em função do teor de Se nos grãos, maior teor de Se (BRS 210, CD 108 e IAC 364) e menor teor de Se (BRS 264, VI 00255 e IAC 375).

Durante o período de florescimento, foram coletadas quatro folhas completamente expandidas de cada parcela, as quais foram imediatamente colocadas no nitrogênio líquido e armazenadas em freezer (-80°C).

A extração total do RNA nas folhas de trigo, foi realizada com o uso do reagente Trizol (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante (Invitrogen) e tratado com DNase livre de RNase (Ambion). Em seguida 4 µg de RNA foram reversamente transcritos em cDNA, utilizando Superscript III transcriptase reversa (Invitrogen) e diluído a um volume final de 20 µL. O cDNA foi diluído cinco vezes em água DEPC e foi submetido ao PCR semi-quantitativo, com um gene controle endógeno para o trigo. O PCR em tempo real foi feito com três repetições do método e duas repetições biológicas utilizando ABI PRISM 7500 *Real-Time PCR* (Applied Biosystems), com o sistema de detecção *SYBR Green*, para os primers apresentados na tabela 1. A expressão relativa foi calculada de acordo com a metodologia descrita anteriormente (Lyi et al., 2007). Para o cálculo comparativo dos CTs (Ciclo Threshold) foram utilizados 2 controles endógenos.

Tabela 1. Sequência de primers sintetizadas para amplificar alguns genes relacionados ao transporte e metabolismo do Se e S.

Gene	Sequência (5' - 3')		Acesso
	F - Forward e R - Reverse		
<i>Sultr1;1</i>	F - CCGTAACCATTGCCCTTCAG	R - GTACATTTCCCCATACTGACTCC	AJ512817.1
<i>APS1</i>	F - CCAAGGCTCGTATTAATG	R - TCAGCATCATAAAGGTCCC	TC307321
<i>APS2</i>	F - AGAACCCCCCTGATGGA	R - TCGGTTTCGCCAACCTCTT	TC322827
<i>APR1</i>	F - AAATCGCCATCGCCTTCA	R - CGTCCAGTCAGTTTCGCGTAT	TC304847
<i>Catalase</i>	F - TCTTCTCCTACTCCGACAC	R - CGTAGTGGTTGTTGTGGTG	D86327.1
<i>GSH</i>	F - TTCACCGTCAAGGATGCAAG	R - GGTCAAGCCACACTGCGAAG	AJ010455.1
<i>Controle endógeno</i>	F - CAGGGCCTCATTTTTGTTGT	R - CAGCTCATCCTCATTCAGCA	TC373628
<i>Controle endógeno</i>	F - GAGGAGGATGAGGTGGATGA	R - CACACTCCTGCGTGCATACT	TC400450

2.4. Análises estatísticas

Todos os resultados foram submetidos à análise de variância, as diferenças significativas entre os tratamentos foram separadas utilizando teste de Scott-Knott (nível de confiabilidade de 0,05) utilizando o software Sisvar 4.6 (Build 6.1) (Ferreira, 2011). Os gráficos foram feitos

no programa Sigma Plot (versão 12.0, Systat Software Inc., Chicago, IL, USA).

3. Resultados e Discussão

As variáveis fitotécnicas avaliadas (produção de massa seca, altura das plantas, número de espigas por planta, número de espiguetas por espiga, número de grãos por espiguetas e peso de 1000 grãos) não foram influenciadas pela aplicação de Se e nem pela interação entre aplicação de Se e cultivares de trigo. Observou-se apenas o efeito isolado das cultivares de trigo, o que pode ser atribuído à manifestação das características intrínsecas a cada uma delas.

Sabe-se que o Se em plantas tem efeito duplo. Em baixas concentrações, devido ao aumento da atividade antioxidante, pode aumentar a produtividade das plantas (LYONS et al., 2009; RAMOS et al., 2011) e em concentrações elevadas compromete o desenvolvimento vegetal, devido a oxidação das células e a toxidez.

No Reino Unido, o trigo é cultivado em solos com baixo teor natural em Se. Em experimento com aplicação de selenato de sódio em trigo foi constatado que a produtividade não foi afetada pela adubação

com Se, apesar do efetivo aumento do teor de Se nos grãos (Broadley et al., 2010).

A aplicação de selenato nas plantas de trigo aumentou o teor (Figura 1 A, B e C) e o acúmulo de Se (Figura 2 A) na parte aérea, raízes e grãos, para todas as cultivares avaliadas. Observa-se que, não necessariamente, o maior teor de Se obtido em dada cultivar é acompanhado por maior acumulação do elemento nessa cultivar. Como a acumulação de um elemento é dependente do seu teor no tecido e, principalmente, da produção de massa seca, de maneira geral, a acumulação segue a mesma tendência da massa produzida.

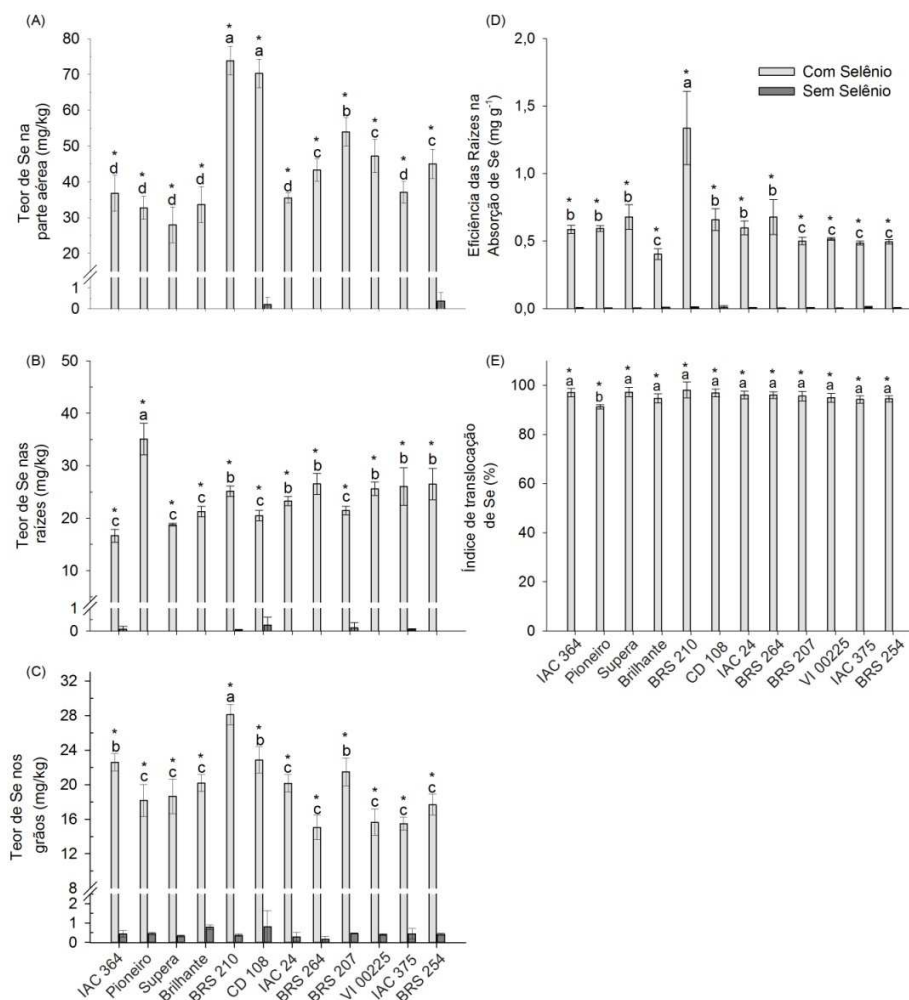


Figura 1. Teor de Se na parte aérea (A), raízes (B) e grãos (C) e eficiência das raízes na absorção do selênio (D) e índice de translocação de selênio (E), em cultivares de trigo com ou sem a aplicação de selenato de sódio. Letras iguais comparando cultivares do tratamento com Se, não diferem entre si ($p \leq 0,05$). Asterisco (*) compara a presença ou ausência de selenato de sódio dentro de cada cultivar.

Para efeito da biofortificação de alimentos no trigo, há de se considerar a parte comestível da planta, os grãos. Desse modo, o maior teor de Se nos grãos foi encontrado para a cultivar BRS 210, e os menores valores foram identificados para as cultivares Pioneiro, Supera, Brilhante, IAC 24, BRS 264, VI 00225, IAC 375 e BRS 254 (Figura 1C).

Os dados de eficiência das raízes na absorção do Se apresentam diferença entre as cultivares avaliadas (Figura 1D). A cultivar BRS 210 se destacou na absorção de Se. Diferentes materiais genéticos expressam diferentes respostas para teores de Se (Lyons et al., 2005). Assim, a escolha de cultivares que sejam mais eficientes para absorção do Se pode, por exemplo, gerar ganhos significativos em um programa de biofortificação.

Com exceção à cultivar Pioneiro, as demais cultivares não diferem quanto ao índice de translocação de Se (Figura 1E). Os resultados mostram que, quase a totalidade do Se absorvido pelas raízes foi translocado para a parte aérea e grãos nas cultivares de trigo. Esse fato é comprovado pelas figuras 2A e 2B onde se observa que do total de Se absorvido, apenas uma pequena parte permanece nas raízes.

As diferenças das cultivares para o acúmulo do Se (Figura 2A) está relacionado às características genéticas das plantas, que expressam e controlam a absorção, translocação e o acúmulo do elemento nos grãos (Zhao et al., 2009; Bóna et al., 2009). Em trabalho que avaliou os teores de Se em grãos de diferentes genótipos de trigo na Austrália, foi encontrado variação da ordem de 144 vezes, materiais com $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ até materiais com $720 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Lyons et al., 2005).

Em geral mais de 90% do Se absorvido pelas plantas foi translocado para a parte aérea e grãos (Figura 2B). A facilidade de absorção e transporte do selenato pelo xilema tem sido relatada em diversos trabalhos (Boldrin et al., 2012; Ramos et al., 2011; Sharma et al., 2010).

Devido à insignificante absorção e acúmulo de Se nas plantas dos tratamentos sem Se, o índice de translocação (Figura 1E) e a distribuição percentual do elemento (Figura 2B) nesses tratamentos não foram calculados. A detecção de Se nas cultivares de trigo em tratamentos que não receberam o selenato (Figura 1A, B e C e 2B) pode ser atribuída ao

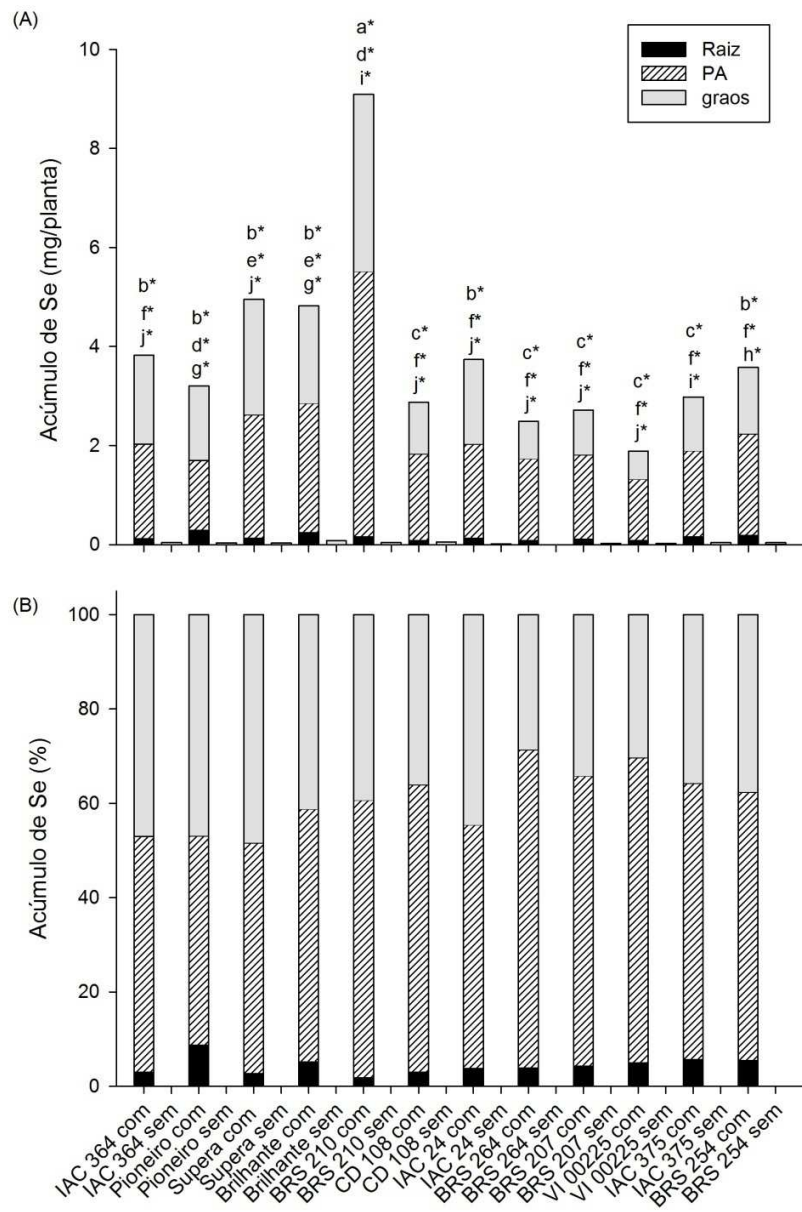


Figura 2. Acúmulo (A) e distribuição percentual (B) de selênio em partes da planta de trigo em função de cultivares de trigo e da presença ou ausência de selenato de sódio.

Letras diferentes a, b, c para acúmulo de Se nos grãos; d, e, f para acúmulo de Se na parte aérea; g, h, i, j para acúmulo de Se nas raízes) indicam diferença significativa entre as médias das cultivares com a aplicação de Se (Scott-Knott, $p < 0,05$). (*), comparando-se com e sem a aplicação de Se dentro de cada cultivar, diferem entre si (Scott-Knott, $p \leq 0,05$).

Se volátil (Zhu et al., 2009) presente no ambiente oriundo das plantas que foram tratadas com esta forma de Se.

De maneira geral os teores dos macronutrientes foram mais afetados pela presença de selenato do que dos micronutrientes.

Os teores na parte aérea de K, Ca, Mn e Zn não foram influenciados pela interação entre cultivares e Se. Houve diferença apenas entre as cultivares, o que pode estar relacionado às características das próprias cultivares. Cu e Fe não apresentaram diferença significativa.

Os teores na parte aérea de N, P, Mg e S foram influenciados pela interação entre cultivares e Se (Figura 3). Não houve uma tendência geral no comportamento dos teores na parte aérea de N, P e Mg para as cultivares em função da aplicação de selenato. Para o teor de N na parte aérea (Figura 3A) somente as cultivares CD 108 e VI 00225 apresentaram aumento no teor com a aplicação de Se, as demais cultivares não foram

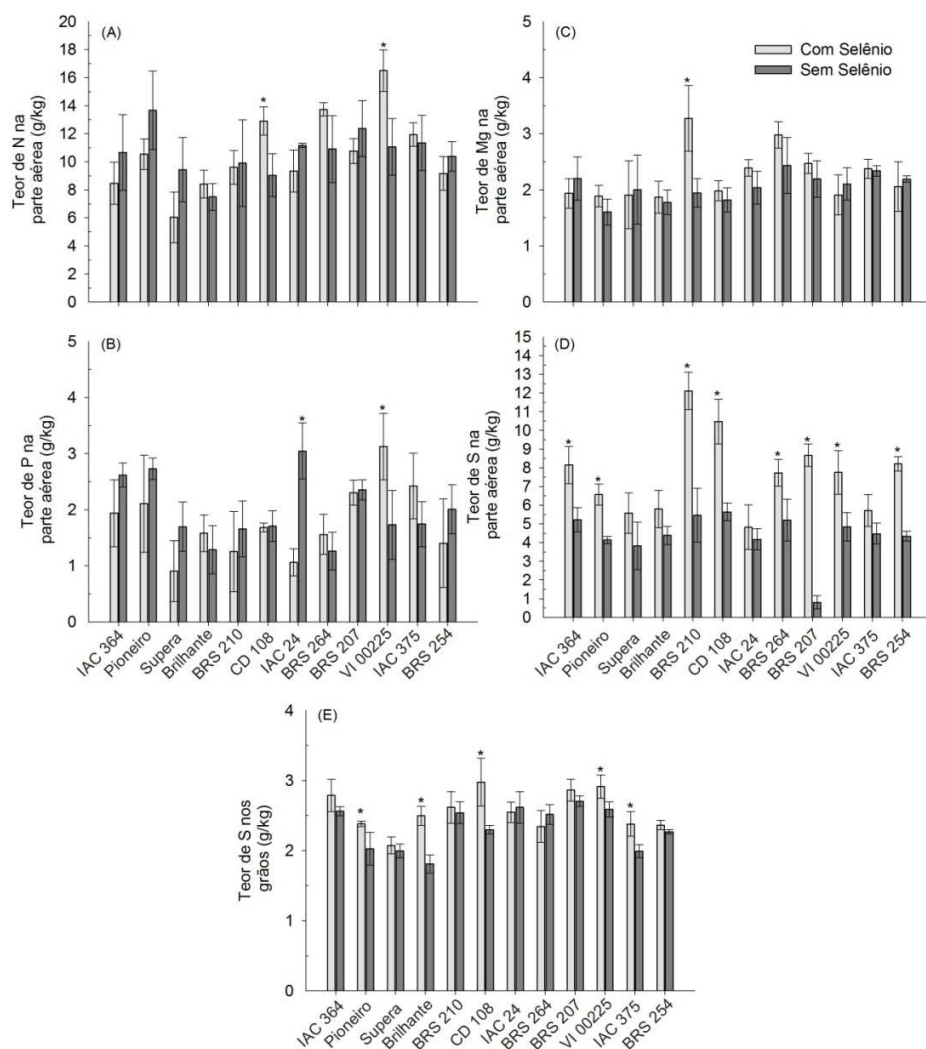


Figura 3. Teores de N (A), P (B), Mg (C) e S (D) na parte aérea e teor de S nos grãos (E), em cultivares de trigo com ou sem a aplicação de selenato de sódio. Asterisco (*) compara a presença ou ausência de selenato de sódio dentro de cada cultivar.

influenciadas. O teor de P na parte aérea (Figura 3B) foi aumentado para a cultivar VI 00225 e diminuído para a cultivar IAC 24 em função da aplicação de selenato, as demais cultivares não foram influenciadas. Para o teor de Mg na parte aérea (Figura 3C) somente a cultivar BRS 210 teve aumento do teor em função da aplicação de selenato e as demais cultivares não foram influenciadas.

Ríos et al. (2010) testando fontes e concentrações de Se em plantas de alface, verificaram diminuição nos teores de N-NO_3^- com aumento da concentração de Se aplicado. Em estudo para avaliar a aplicação de 2 μM de selenato de sódio em plantas de trigo, foi verificado que não houve alteração dos teores de P e Mg nas plantas (Zembala et al., 2010). Souza et al. (2013) testando o efeito da aplicação de selenato (10 μM) e selenito (10 μM) em diferentes materiais de trigo constataram que não houve influencia nos teores foliares de P e K. Os mesmos autores verificaram que a aplicação do selenato aumentou o teor foliar de Mg em mais da metade das cultivares avaliadas.

Por outro lado, a aplicação de selenato promoveu aumento do teor de S na parte aérea para oito das doze cultivares avaliadas (Figura 3D). O

efeito sinérgico entre o selenato e o sulfato é bastante relatado (Boldrin et al., 2012; Ramos et al., 2011; White et al., 2004; Souza et al., 2013).

A avaliação dos teores dos nutrientes nos grãos apresentou interação entre cultivares e Se somente para o teor de S (Figura 3E). N, P, K, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn foram influenciados apenas pelas cultivares, o que pode ser atribuído às características das próprias cultivares.

Boldrin et al. (2013) avaliando formas de aplicação e fontes de Se em arroz, verificaram que a aplicação de $0,75 \text{ mg kg}^{-1}$ de selenato no solo não alteraram os teores nos grãos de N, P, S, Fe e Cu. Os autores verificaram ainda que tanto a aplicação de selenato quanto a aplicação de selenito possibilitaram aumento dos teores de Mg e Mn nos grãos e somente a aplicação de selenato aumentou os teores de Zn.

Os genes avaliados neste trabalho estão relacionados à absorção e ao metabolismo do S. Há competição entre S e Se pelo sistema enzimático envolvido na absorção e translocação, o que se justifica pela proximidade das propriedades químicas entre S e Se, e ao fato do Se utilizar as mesmas rotas de assimilação do S (Pilon-Smits et al., 2009).

Os resultados das análises de expressão do gene *Sultr1;1* não permite identificar uma tendência geral no comportamento das cultivares,

pois algumas aumentam e outras diminuem a expressão em função da aplicação de selenato de sódio (Figura 4A).

O gene *Sultr1;1* pertence ao grupo 1 da “família” dos genes transportadores de sulfato (Hawkesford and De Kok, 2006) e sua expressão apesar de não exclusiva, ocorre predominantemente nas raízes (Smith et al., 1995). No entanto, Ramos et al. (2011) verificaram aumento da expressão de *Sultr1;1* em folhas de alface, quando as plantas foram tratadas com selenato.

De acordo com os dois grupos pré-definidos em função do teor de Se, as cultivares BRS 210 e IAC 364 (com maiores teores de Se nos grãos) apresentaram diminuição da expressão do gene *APS2*, já as cultivares VI 00225 e IAC 375 (com menores teores de Se nos grãos) apresentaram aumento na expressão do gene *APS2* (Figura 4B). Por outro lado, a expressão dos genes *APSI* e *APRI* diminuíram para quatro das seis cultivares avaliadas (Figura 4D e 4E, respectivamente).

A ATP sulfúrilase atua na transformação do selenato absorvido em adenosina fosforoselenato (APSe). As isoformas *APSI* e *APS2* exercem suas atividades em locais diferentes na planta: a *APSI* está localizada no cloroplasto enquanto a *APS2* desempenha suas funções no

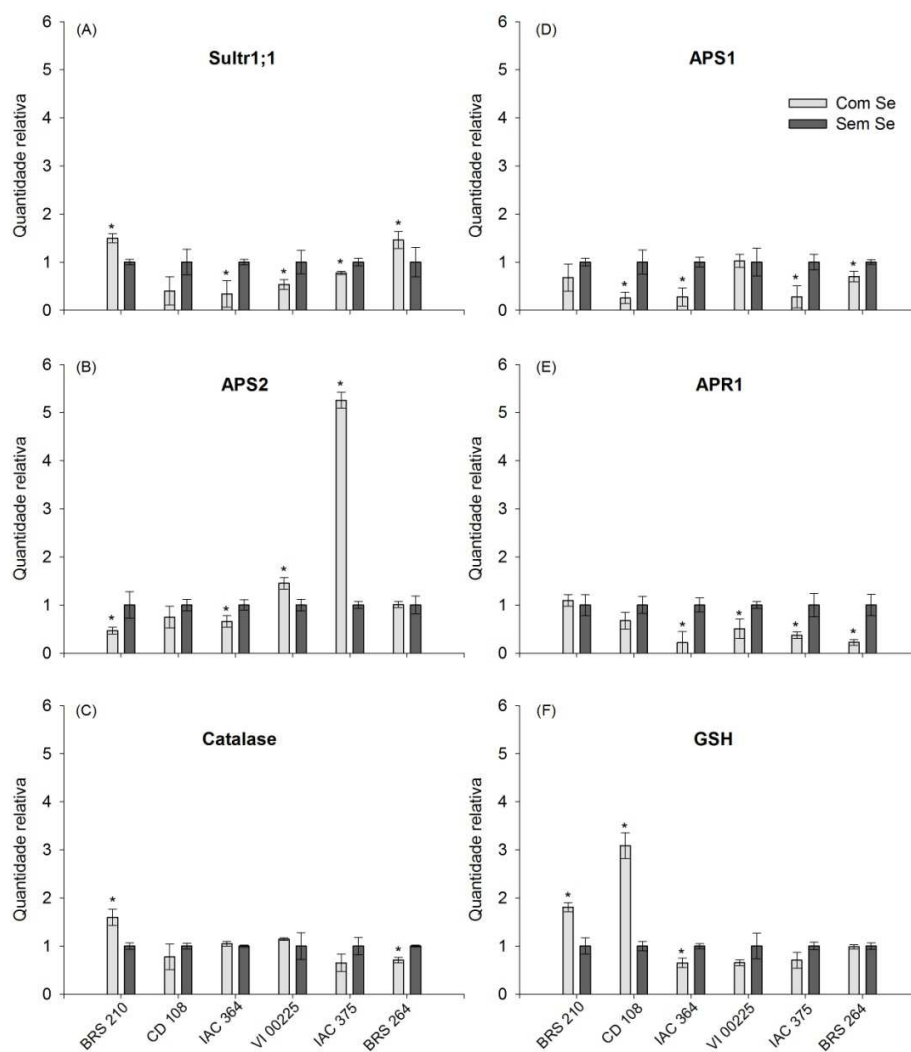


Figura 4. Quantidade relativa de expressão de genes de *Sultr1;1* (A), *APS2* (B), *Catalase* (C), *APS1* (D), *APR1* (E) e *GSH* (F) nas folhas de cultivares de trigo com ou sem a aplicação de selenato de sódio. Asterisco (*) compara a presença ou ausência de selenato de sódio dentro de cada cultivar.

citósol (Rotte e Leustek, 2000). Ramos et al (2011) avaliando o efeito da aplicação de selenato em folhas de alface não encontraram alteração na expressão de *APS2*.

Os resultados da expressão da *APS2* poderiam sugerir que em cultivares com os maiores teores de Se, que também apresentam aumento nos teores de S, tanto a quantidade do reagente da reação de formação da *APSe* (ou seja, a quantidade de Se) quanto a quantidade do reagente da reação de formação da *APS* (o S), são maiores, o que poderia diminuir a velocidade da reação, para assegurar o equilíbrio dos compostos formados. Porém, trabalhos têm mostrado que baixos teores de S nas folhas seria o gatilho para induzir a absorção do nutriente; no entanto o contrário não ocorre, ou seja, elevados teores de sulfato não geram uma resposta negativa para a absorção, muito provavelmente devido ao S ser armazenado nos vacúolos (Matthewman et al., 2012; Koprivova et al., 2013).

A *APR* está localizada exclusivamente nos cloroplastos (Rotte e Leustek, 2000) e atua na redução da *APSe* a selenito e esta reação ocorre com auxílio da *GSH* (glutathiona peroxidase) que contribui com dois elétrons para essa redução. Ramos et al (2011) verificaram que a

aplicação de selenato em alface promove aumento da expressão da *APRI* em plantas com maiores teores de Se e diminuição da expressão em plantas com menores teores de Se. Observa-se na Figura 4E que das quatro cultivares que apresentaram diminuição da expressão da *APR*, três pertencem ao grupo de cultivares identificadas com menores teores de Se.

Para a expressão do gene que controla a catalase apenas duas cultivares foram alteradas em função da aplicação de selenato. A BRS 210 (classificada no grupo de maior teor de Se) teve aumento e a BRS 264 (classificada no grupo de menor teor de Se) teve diminuição da expressão do desse gene (Figura 4C).

Diversos trabalhos têm mostrado aumento da atividade da catalase em plantas tratadas com pequenas doses de Se (Pennanen et al., 2002; Xue et al., 2001), porém quando expostas a doses elevadas do elemento podem acarretar em danos incluindo diminuição de produtividade. Kumar et al. (2014) estudando o efeito da aplicação de Se em plantas de arroz, observaram aumento da expressão dos genes que controlam a catalase.

Somente as cultivares do grupo de maior teor de Se tiveram a expressão do gene *GSH* alterada. Duas cultivares apresentaram aumento e uma apresentou diminuição da expressão do gene (Figura 4F). Sabe-se

que a glutathione é uma das formas orgânicas de S que possibilita sua translocação nas plantas (Rennenberg, Schmitz & Bergmann, 1979), atua no sistema antioxidante das plantas e com o auxílio da glutathione redutase mantém sua forma reduzida (Marschner, 2012). Diao et al. (2014) avaliando a influência do Se na expressão do gene que controla a glutathione, verificaram não haver correlação entre Se e a expressão de *GSH*.

4. Conclusões

A presença de Se na solução de cultivo na concentração utilizada, não alterou o crescimento e produção das cultivares de trigo.

Houve variação genotípica entre as cultivares nos teores e acúmulo de Se nos grãos do trigo.

Das doze cultivares avaliadas, a aplicação de selenato promoveu aumento no teor de S em oito cultivares na parte aérea e em cinco cultivares nos grãos.

Os resultados da expressão gênica não permite identificar, nas condições avaliadas, um padrão de comportamento das cultivares com a aplicação de selenato.

5. Referências Bibliográficas

BOLDRIN, P. F., FAQUIN, V., RAMOS, S. J., BOLDRIN, K. V. F., ÁVILA, F. W., GUILHERME, L. R. G. Soil and foliar application of selenium in rice biofortification. *Journal of Food Composition and Analysis*, 31, 238–244, 2013.

BOLDRIN, P. F.; FAQUIN, V.; RAMOS, S. J.; GUILHERME, L. R. G.; BASTOS, C. E. A.; CARVALHO, G. S.; COSTA, E. T. S. Selenato e selenito na produção e biofortificação agronômica com selênio em arroz. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, 47, 831-837, 2012.

BÓNA, L.; ADÁNYI, N.; FARKASb, R.; SZANICsb, E.; SZABÓb, E.; HAJÓsb, GY.; PÉCSVÁRADI, A.; ÁCS, E. Variation in crop nutrient accumulation: selenium content of wheat and triticale grains. *Acta Alimentaria*, 38, 9-15, 2009.

BROADLEY, M. R., J. ALCOCK, ET AL. (2010). "Selenium biofortification of high-yielding winter wheat (*Triticum aestivum* L.) by liquid or granular Se fertilisation." *Plant and Soil* 332(1-2): 5-18.

COMBS, G.F. Selenium in global food systems. *British Journal of Nutrition*, v. 85, p.517-547, 2001.

CUBADDA, F., AURELI, F., CIARDULLO, S., D'AMATO, M., RAGGI, A., ACHARYA, R., REDDY, A. V. R., PRAKASH, N. T. Changes in Selenium Speciation Associated with Increasing Tissue Concentrations of Selenium in Wheat Grain. *J. Agric. Food Chem.*, v. 58, n. 4, 2010.

DIAO, Y.; XU, H.; LI, G.; YU, A.; YU, X.; HU, W.; ZHENG, X.; LI, S.; WANG, Y.; HU, Z. Cloning a glutathione peroxidase gene from *Nelumbo nucifera* and enhanced salt tolerance by overexpressing in rice. *Molecular biology reports*, 41, 4919-4927, 2014.

FERREIRA, D. F. SISVAR : A Computer Statistical Analysis System." *Ciencia e Agrotecnologia*, 35, 1039–1042, 2011.

HAWKESFORD M. J., DE KOK L. J. Managing sulphur metabolism in plants. *Plant, Cell and Environment*. 29, 382-395, 2006.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D. I. The water culture method for growing plants without soils. Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 347p., 1950.

KOPRIVOVA, A.; GIOVANNETTI, M.; BARANIECKA, P.; LEE, B.; GRONDIN, C.; LOUDET, O.; KOPRIVA, S. Natural variation in the ATPS1 isoform of ATP sulfurylase contributes to the control of sulfate levels in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 63, 1133-41, 2013.

KUMAR, A., SINGH, R. P., SINGH, P. K., AWASTHI, S., CHAKRABARTY, D., TRIVEDI, P. K., & TRIPATHI, R. D. Selenium ameliorates arsenic induced oxidative stress through modulation of antioxidant enzymes and thiols in rice (*Oryza sativa* L.). *Ecotoxicology*, 23, 1153-1163, 2014.

LYONS, G. H.; JUDSON, G. J.; ORTIZ-MONASTERIIOC, I.; GENC, Y.; STANGOULISA, J. C. R.; GRAHAMA, R. D. Selenium in Australia: Selenium status and biofortification of wheat for better health. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 19 (2005) 75 – 82.

LYONS, G.; STANGOULIS, J.; GRAHAM, R. High-selenium wheat: biofortification for better health. *Nutrition Research Reviews*, v. 16, p. 45-60, 2003.

LYONS, G. H. et al. Selenium Increases Seed Production in Brassica. *Plant and Soil*. 318, 73–80, 2009.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2. ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 201 p.

MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. 3ed. London: Academic Press, 2012. 651p.

MATTHEWMAN C. A., KAWASHIMA C. G., HUSKA D., CSORBA T., DALMAY T., KOPRIVA S. miR395 is a general component of the sulfate assimilation regulatory network in Arabidopsis. *FEBS Lett.* 586, 3242–3248, 2012.

PENNANEN, A.; XUE, T.; HARTIKAINEN, H. Protective role of selenium in plant subjected to severe UV irradiation stress. *Journal of Applied Botany*, 76, 66-76, 2002.

PILON-SMITS EAH, QUINN CF, TAPKEN W, MALAGOLI M, SCHIAVON M. Physiological functions of beneficial elements. *Curr Opin Plant Biol.* 12, 267-274, 2009.

RAMOS, S. J. et al. Selenium accumulation in lettuce germplasm. *Planta*, Berlin, v. 233, n. 4, p. 649-660, Apr. 2011.

RAMOS, S.J.; ÁVILA, F.W.; BOLDRIN, P.F.; PEREIRA, F.J.; CASTRO, E.M.; FAQUIN, V.; REIS, A.R.; GUILHERME, L.R.G. Response of brachiaria grass to selenium forms applied in a tropical soil. *Plant, Soil and Environment*, v.11, p.521-527, 2012.

RAYMAN, M. P. The argument for increasing selenium intake. *Proceedings of the Nutrition Society*, Cambridge, v. 61, n. 2, p. 203-215, Apr. 2002.

RENNENBERG H., SCHMITZ K. & BERGMANN L. (1979) Long-distance transport of sulfur in *Nicotiana tabacum*. *Planta* 147, 57–62.

RÍOS, J. J. et al. Biofortification of Se and induction of the antioxidant capacity in lettuce plants. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 116, n. 3, p. 248-255, May 2008.

RÍOS, J. J.; BLASCO, B.; CERVILHA, L.; RUBIO-WILHELMI, M. M.; ROSALES, M. A.; SANCHEZRODRIGUEZ, E.; ROMERO, L.; RUIZ, J. M. Nitrogen-use efficiency in relation to different forms and application rates of Se in lettuce plants. *Journal of Plant Growth Regulation.* 29, 164-170, 2010.

ROTTE, C, and LEUSTEK, T. Differential Subcellular Localization and Expression of ATP Sulfurylase and 5'-Adenylylsulfate Reductase during Ontogenesis of Arabidopsis Leaves Indicates That Cytosolic and Plastid Forms of ATP Sulfurylase May Have Specialized Functions. *Plant physiology*, 124, 715–24. 2000.

SHARMA, S. et al. Comparative effects of selenate and selenite on growth and biochemical composition of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Plant and Soil*, The Hague, v. 329, n. 1/2, p. 339-348, Apr. 2010.

SHEWRY, P.R. Wheat. *Journal of Experimental Botany*, v. 60, n.6, p.1537-1553, 2009.

SMITH F.W., HAWKESFORD M.J., PROSSER I.M. & CLARKSON D.T. Isolation of a cDNA from *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a high affinity sulphate transporter at the plasma membrane. *Molecular General Genetics*, 247, 709-715, 1995.

SOUSA, DE G. A.; CARVALHO, DE J. G.; RUTZKE, M.; ALBRECHT, J. C.; GUILHERME, L. R. G.; LI, L. Evaluation of germplasm effect on Fe, Zn and Se content in wheat seedlings. *Plant Science*, 210, 206-213, 2013.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Dietary reference intakes: elements. Washington, 2003. Disponível em: <<http://www.iom.edu/Global/News%20Announcements/~media/48FAA A2FD9E74D95BBDA2236E7387B49.ashx>>. Acesso em: 15 de março de 2015.

WHITE, P. J.; BOWEN, H. C.; PARMAGURU, P.; FRITZ, M.; SPRACKLEN, W. P.; SPIBY, R. E.; MEACHAM, M. C.; MEAD, A.; HARRIMAN, M.; TRUEMAN, L. J.; SMITH, B. M.; THOMAS, B.; BROADLEY, M. R. Interactions between selenium and sulphur nutrition in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 55, 1927-1937, 2004.

WHITE, P. J.; BROADLEY, M. R. Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets - iron, zinc, copper,

calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytol*, v.182, p. 49-84, 2009.

XUE, T.L.; HARTIKAINEN H.; PIIRONEN V. Antioxidative and growth-promoting effect of selenium on senescing lettuce. *Plant Soil*. 237, 55-61, 2001.

ZEMBALA, M. et al. Effect of Selenium on Macro- and Microelement Distribution and Physiological Parameters of Rape and Wheat Seedlings Exposed to Cadmium Stress. *Plant and Soil*, 329, 457-468, 2010.

ZHAO, F. J.; SU, Y. H.; DUNHAM, S. J.; RAKSZEGI, M.; BEDO Z.; MCGRATH, S. P.; SHEWRY, P. R. Variation in mineral micronutrient concentrations in grain of wheat lines of diverse origin. *J. Cereal Sci.*49, 290-295, (2009).

ZHU, et al. Selenium in Higher Plants: Understanding Mechanisms for Biofortification and Phytoremediation." *Trends in Plant Science*. 14, 436-442, (2009).

ARTIGO 2

**Selenium-induced plant growth and sulfur accumulation in wheat
plants**

(Artigo submetido à revista Plant Science)

Selenium-induced plant growth and sulfur accumulation in wheat plants

Paulo Fernandes Boldrin^{a,b,c}, Marislaine Alves de Figueiredo^{a,b,c},
Valdemar Faquin^c, Luiz Roberto Guimarães Guilherme^c, Shree Giri^a,
Jonathan J Hart^a, Li Li^{a,b,*}

^a Robert W. Holley Center for Agriculture and Health, USDA-ARS,
Cornell University, Ithaca, NY 14853, USA.

^b Plant Breeding and Genetics Section, School of Integrative Plant
Science, Cornell University, Ithaca, NY 14853, USA

^c Department of Soil Science, Federal University of Lavras, Zip Code
3037, 37200-000 Lavras, MG, Brazil

* Corresponding authors: Email: ll37@cornell.edu; Tel: +1-607-255-
5708; Fax: +1-607-255-1132

E-mails:

pfboldrin@gmail.com (P.F. Boldrin); marislaine_alves@yahoo.com.br
(M.A.de Figueiredo); vafaquin@dcs.ufla.br (V. Faquin); guilherm@dcs.ufla.br
(L.R.G. Guilherme); skg29@cornell.edu (S.K. Giri);
jjh16@cornell.edu (J.J. Hart); ll37@cornell.edu (L. Li).

Highlights

- Low dosages of both selenate and selenite enhance biomass of wheat plants.
- Increasing Se supply at low dosages promotes continuously enhanced S levels.
- Selenate treatment mimics S starvation to activate *SULTR1;1* and *SULTR1;3*.
- Selenate supply down-regulates *APS1* and *APR2* expression.
- Synergistic effect results from promoting S uptake and reducing assimilation.

ABSTRACT

Selenium (Se) is an essential micronutrient for animals and humans and a target for biofortification in crops. To advance the knowledge of Se nutrition in plants, the effects of Se dosages and forms on plant growth as well as on Se and sulfur (S) accumulation in seven wheat lines were examined. Low dosages of both selenate and selenite supplements were found to enhance wheat shoot biomass, but exert limited effect on grain production. The stimulation on plant growth was correlated with increased APX antioxidant enzyme activity. Interestingly, selenate supply promoted S accumulation in wheat plants, which was not observed with selenite treatment. The continuous over 3-fold increase of S levels following selenate treatment at low dosages was observed in shoots of all wheat lines. Selenate treatment was noticed to mimic S starvation to activate the expression of *SULTR1;1* and *SULTR1;3* in roots. The selenate-induced S accumulation in wheat shoots was likely to be caused by a combination action of selenate-promoted expression of *SULTR1;1* and *SULTR1;3* in roots with enhanced capacity of uptake, and reduced expression of *APS1* and *APR2* in shoots with decreased S assimilation. This study supports that plant growth and nutrition benefit from low dosages of Se fertilization and provides information on the basis underlying Se-induced S accumulation in plants.

Keywords

Selenium, sulfur, wheat, uptake kinetics, gene expression, antioxidant enzyme

1. Introduction

Selenium (Se) is essential for animals and humans because it is a component of glutathione peroxidase and other selenoproteins [1]. However, Se essentiality in plants is not established, although there are reports showing that Se is beneficial for some plants [2]. All plants uptake Se, but they differ in their abilities to uptake and accumulate this element. Se levels in plants vary with plant species, stage of development, and biogeochemical factors that influence selenium availability in the soil. Based on their abilities to accumulate Se, plant species are classified as Se non-accumulators, secondary accumulators, and Se hyperaccumulators [3, 4].

Selenium is taken by plants from soil in different forms, i.e. in inorganic forms as selenate and selenite, and in organic forms as selenomethionine and selenocysteine. Selenate and selenite are the primary forms of Se source existed in soil. Selenate is up taken in plant roots by sulfate transporters, and plant species show different selectivity between sulfur and selenate [3]. Due to chemical similarity between sulfur (S) and selenium, antagonistic relation between selenate and sulfate uptake is generally observed in plants when high dosages of selenate or sulfate are used [5, 6, 7]. However, studies show that selenate can increase sulfur content when low dosages of selenate are applied to plants. This was observed in cases such as in rice, lettuce, wheat, and barley [8, 9, 10, 11]. By contrast, less information on the uptake of selenite is available. Selenite is believed to be taken up into plants passively and/or by phosphate transporters [12, 13]. Selenite was shown

to be not effective to increase sulfur content in lettuce [9] and suppress sulfur accumulation in seedlings of some wheat lines [11].

Sulfur is an essential nutrient for plants and possesses a plethora of functions [14, 15]. Sulfur serves as a component of important amino acids cysteine and methionine to be incorporated into enzymes and proteins. It is also found in vitamins (biotin and thiamine), cofactors (CoA and S-adenosyl-L-methionine), and some secondary metabolites. Sulfur not only plays structural, catalytic, and regulatory functions, but also acts as a major cellular redox buffer to protect the cells from oxidative stress. The supply of S to plants is essential for vegetative growth and allows production of seeds with high quality [16]. Thus, S nutrition influences agriculture and food quality. Sulfate is the primary source of S for plants and represents the most stable form of S in soil. Sulfate is taken up into roots from the soil by plants through the root plasma membrane by sulfate transporters, and its uptake is impacted by the presence of Se.

Wheat is a major staple crop that is cultivated and processed on a large scale worldwide. The success of global growth of this crop is related to wheat adaptability to different environments, high productivity, and associated product characteristics such as baking properties [17]. Wheat is the third cereal crop produced in the world and the second main food crop [18]. Wheat serves as a major dietary source of Se in humans and animals [19]. Despite wheat is considered a non-Se-accumulator [3], biofortification with Se in wheat has been practiced with success [19, 20].

Considering the importance of wheat for world feeding and that approximately 15% of the world population are selenium deficiency [20],

the aim of this study was to advance the knowledge on Se biofortification under selenate and selenite treatment in wheat cultivars. In addition, Se supplement was found to directly affect S level, thus it is important to understand how sulfur nutrition is influenced by Se in this crop.

2. Material and methods

2.1. Wheat germplasm and plant growth

A population of seven wheat (*Triticum aestivum* L.) lines was used in this study. These lines were selected from a wheat breeding program in the Plant Breeding and Genetics Section at Cornell University. They possessed different characteristics with three lines being soft white winter (SWW), one line being hard white spring (HWS), two lines being hard red spring (HRW), and one line being soft red winter (SRW) (Table 1).

Seeds of these lines were disinfected in 10% NaOCl solution for 10 min, washed extensively in distilled water followed by in distilled milli-Q water, and germinated on moistened filter paper in a growth chamber at 22°C for 3 days essentially as described previously [11]. The uniform 3 day-old young seedlings were transplanted into 2.2 L dark pots that contained modified Johnson's nutrient solution for wheat [21]. The seedlings were grown in a greenhouse at 21°C with a 14-h light and 10-h dark photoperiod under constant aeration.

2.2. Selenate and selenite treatment

For treatments with seedling dosage experiment, seedlings from the seven wheat lines were grown for four days in the modified Johnson's nutrient solution. On the fifth day, these plants were either kept in the modified Johnson's nutrient solution as control treatment or exposed to the nutrient solution containing Na_2SeO_4 at four different concentrations (1, 5, 10 or 20 μM) or Na_2SeO_3 at three different concentrations (1, 5, or 10 μM). The experimental design was completely randomized in a 7 x 2 x 4 factorial scheme with an additional as follows: seven lines, two forms of Se (selenate – Na_2SeO_4 and selenite – Na_2SeO_3), and four concentrations (0, 1, 5, or 10 μM) with an additional of 20 μM selenate. The treatments had four replicates, resulting in a total of 252 plants. The nutrient solutions were changed twice a week. After 10 days of Se treatments, plants were washed in distilled water and harvested individually. The very young leaf and young root samples were collected, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C for qRT-PCR and antioxidant enzyme activity analyses. Shoots and roots were separated. The shoots were weighed for fresh weight, put to dry at 65°C for three days, and used for total Se and S content analyses.

For selenate treatment during seed production, plants from lines 2, 3 and 4 (Table 1) were grown until flowering time in the modified Johnson's nutrient solution, which was changed twice a week. These plants were then either kept in the nutrient solution as controls or exposed to the nutrient solution containing 5 μM Na_2SeO_4 until seed mature. The experimental design was completely randomized in a 3 x 2 factorial scheme as follows: three lines with and without application of selenate. The treatments contained 4 repeats with a total of 24 plants. At the end

when the grains were fully ripe, plants were harvested individually. Shoots, roots (washed extensively in distilled water), and seeds were separated and put to dry at 65°C for three days. The seeds were used for mineral analysis.

2.3. Mineral analysis by ICP

Total mineral contents in the dry samples were determined using an inductively coupled plasma (ICP) emission spectrometer (model iCAP 6000 Series ICP Spectrometer, Thermo Scientific, Cambridge, United Kingdom) following the protocol as described [5]. Dried and ground tissues of 200 mg from each sample were weighed into borosilicate glass test tubes and pre-digested with 4 mL of HNO₃/HClO₄ (60/40%, v/v) at room temperature overnight. The samples were then heated to 120°C for 2 hours, followed by at 195°C for 30 min before adding 20 mL of distilled milliQ water and analyzing using ICP. Blank and internal standard yttrium were used to ensure the accurate of the analytical results obtained.

2.4. Catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) activity assays

Wheat leaves (200 mg) were ground with a pre-cooled mortar and pestle in 3 mL cold extraction buffer containing 50 mM KH₂PO₄-KOH (pH 7.5), 0.1 mM EDTA, 0.5% (w/v) fresh Triton X-100 and 4 % polyvinylpolypyrrolidone (PVPP). Following centrifugation at 13,000 rpm for 10 min at 4°C, the supernatant was used for enzyme activity

assays. CAT and APX activities were measured spectrophotometrically at 240 and 290 nm, respectively, essentially following the methods described previously [9].

To determine the CAT activity, the enzyme extract was added to the reaction mixture (1 mL) containing 100 mM of PBS (pH=7.0). The reaction was initiated by adding 10 μ L of 10% (w/v) H₂O₂. Activity was determined by monitoring the decrease of absorbance at 240 nm and calculated using the extinction coefficient of 39.4 mM⁻¹ cm⁻¹.

To determine the APX activity, the enzyme extract was added to the reaction mixture (1 mL) containing 50 mM Hepes-KOH (pH 7.6), 0.1 mM EDTA, and 0.5 mM reduced ascorbate. The reaction was initiated by adding H₂O₂ to 0.4 mM. Activity was determined by monitoring the decrease of absorbance at 290 nm and calculated using the extinction coefficient of 2.8 mM⁻¹ cm⁻¹.

2.5. RNA isolation, reverse transcription and quantitative real-time PCR

Total RNA from leaves and roots were extracted using Trizol reagent (Invitrogen) following the manufacturer's instruction (Invitrogen) and treated with RNase-free DNase (Promega). RNA (4 μ g) was reverse transcribed into cDNA in a volume of 20 μ L using Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen). The synthesized cDNA were diluted five times in DEPC water and checked first by amplifying wheat *Actin* gene using semi-quantitative PCR. Quantitative real-time PCR was done with three techniques replicates for each of two biological repeats. The relative

expression was calculated following the methodology described previously [22].

2.6. Kinetics experiment

Wheat line 1 was utilized to conduct this experiment. Seeds were treated with 10% bleach and put to germinate on moistened filter paper in a chamber at 22°C for three days. Seedlings were then transferred to containers with Hoagland and Arnon solution [23] containing 1/10 of the ionic strength (pH adjusted to 5.5 ± 0.2), which was changed each three days during 15 days. Seedlings were grown under 12 hours of photoperiod with light intensity of $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at $20^\circ\text{C} \pm 2$ during the day and $17^\circ\text{C} \pm 2$ during the night. Prior to starting the kinetics experiments, plants were moved to a modified Hoagland and Arnon solution without S for 24 hours. Based on preliminary tests, a concentration of $0.03 \mu\text{M}$ of S was used for the kinetic experiment. The experiment included one control with four wheat plants in the Hoagland and Arnon solution containing 1/10 of ionic strength, and five selenium treatments with four wheat plants in each of the nutrient solution containing 1, 5, 10 or $20 \mu\text{M}$ Na_2SeO_4 , or $5 \mu\text{M}$ Na_2SeO_3 . Solution aliquotes (1 mL) were taken every one hour and their mineral concentrations were determined by ICP. The kinetic parameters of maximum velocity of uptake, maximum influx (V_{max}), constant of Michaelis Menten (K_m) for S were determined by software Cinética [24] using the principle as described by [25]. The minimum concentration (C_{min}), the S concentration below which plants stop the uptake of

nutrients (the net influx of the ion ceases), was determined using the two last sample collects. These parameters were used to calculate the net influx (I).

2.7. Statistical analysis

All results were analyzed using analysis of variance (ANOVA). Significantly different means between treatments were separated with the Tukey's test at the 0.05 significance level of probability, using Sisvar 4.6 software (Build 6.1) [26]. The graphs were made using the Sigma Plot Programme (version 12.0, Systat Software Inc., Chicago, IL, USA).

3. Results and discussion

3.1. Growth responses of wheat cultivars to Se treatments

Our previous study of wheat accessions in response to various mineral treatments including Se shows that wheat seedlings exhibit various growth responses to Se at 10 μM [11]. To examine wheat growth response to different dosages and forms of Se treatments, biomasses of seven wheat lines with diverse characteristics of being soft white winter (lines 1, 5, and 6), hard white spring (line 2), hard red spring (lines 3 and 4), and soft red winter (line 7) were measured. As shown in Figure 1A-B, the dry matter productions of both shoots and roots were significantly increased following supplement with 5 μM Na_2SeO_4 in all cultivars tested except in roots of line 7. Dramatic increase of dry matters was observed in lines 3, 4, 5, and 6, showing the effectiveness of low dosage of selenate

in promoting plant growth. While the dry matter production was higher in lines 3 and 6 treated with 10 μM Na_2SeO_4 , the dosage commonly used in nutrient solutions for Se non-accumulating crops [13, 27], it was similar in the other five lines between control and 10 μM Na_2SeO_4 , consistent with the genetic variation observed in previous studies with Brazil wheat accessions [11]. A general decreased shoot and root dry matters were observed at high dosage of 20 μM Na_2SeO_4 (Fig. 1A).

The dry biomasses of shoots and roots in response to Na_2SeO_3 treatments were also examined. An overall increased biomasses were observed in 5 lines for shoots and 3 lines for roots following supplement with 5 μM Na_2SeO_3 (Fig. 1C-D). Although selenite in general is more toxic than selenate to plant growth [13, 28, 11], its inhibitory effect on plant seedling growth was not observed with these wheat lines at low dosages.

To see if supplement of low dosage of selenate during wheat flowering altered grain production, the effects of application of 5 μM Na_2SeO_4 on number of spikelets and weight of 1000 grains of mature plants were examined in randomly selected three lines. No significant difference on number of spikelets and weight of 1000 grains was observed between control and 5 μM Na_2SeO_4 treatment (Fig. 1E-F). This finding indicates that low dosage of Na_2SeO_4 supplement at flowering time does not reduce crop yield and can be used for selenium biofortification program to enhance grain Se levels.

Selenium is reported to be beneficial for the growth of Se-accumulators [2]. To many Se non-accumulators, high concentrations of

Se supplement inhibit plant growth due to its toxicity in interfering plant normal metabolisms and acting as a prooxidant. Clearly, our results show the beneficial role of Se at low dosages to promote wheat seedling growth, consistent with a previous study [29]. Similar results are observed with a range of plant species, such as lettuce [9], rice [10], and ryegrass [30]. This beneficial effect of Se is likely due to its ability to enhance antioxidant activities in plants, enabling better plant growth [30, 9].

3.2. Accumulation of Se and S in wheat shows different responses to selenate and selenite

Plants have various capacities to accumulate Se. The abilities of these wheat lines to accumulate Se in response to different forms and concentrations of Se treatment were examined. As shown in Figure 2A, the total Se contents in shoots for all the seven lines increased continuously for the dosages of selenate used. A continuous increase of total Se levels in shoots was also observed with an increased concentration of selenite supply (Fig. 2B). Noticeably, up to 10-fold difference in total Se levels was detected in these wheat shoots between treatments with 10 μ M of selenate and selenite (Fig. 2A-B).

The different levels of Se accumulation in shoots in response to selenate and selenite treatments are due to their absorption and mobility differences in plants. Selenate is actively uptake by plants through sulfate transporters with energy expenditure, while selenite uptake is believed to be performed by passively or partially by phosphate transporters [3, 31]. In plants treated with selenate, the Se translocation process is quickly

done through xylem from roots to the shoot tissues. By contrast, selenite is less translocated in xylem and majority of it stay in roots to be readily converted into organic forms as well as unidentified and water-insoluble forms [13]. As a result, total Se level in shoots is observed to be much higher in plants treated with selenate than selenite [9, 30, 11].

Sulfur is an essential nutrient for plants. Because of chemical similarity between Se and S, Se supplement is known to affect S level in plants and often antagonistically [3]. Noticeably, the increasing selenate supply to 10 μM Na_2SeO_4 caused continuously increased accumulation of S in all lines tested (Fig. 2C), showing a correlated change with Se content (Fig. 2A-B). Remarkably, an up to 3.4-fold increase of total S content was observed comparing these wheat plants exposed to none with 10 μM Na_2SeO_4 . The increasing supply of up to 10 μM Na_2SeO_3 exerted minimal effect on or reduced total S content (Fig. 2D), consistent with previous reports that selenite does not enhance S accumulation [32, 11].

Previous studies also report such a synergic interaction between Se and S when plants are supplied with low dosages of selenate. S content is dramatically enhanced by 15 μM Na_2SeO_4 supplement in lettuce [9]. S level is enhanced with increasing concentrations of selenate in *Arabidopsis* [6]. An increasing selenate concentrations in nutrient solution until 3.5 mg of $\text{Na}_2\text{SeO}_4/\text{L}$ results in up to 2.5-fold increase of S content in leaf tissues of Kale [32]. While selenate was reported to promote S translocation to shoots in a soft wheat line, interestingly, the significant increase of shoot S accumulation was found to require high concentrations of selenate application [29], the levels that are toxic even to some Se-accumulators like broccoli [5]. The stimulation of S uptake by

selenate has been suggested to be due to its ability in preventing the reductions of sulfate transporter abundance and/or activity by sulfate and/or its metabolites, thus increasing S uptake [6].

To investigate whether the wheat roots like shoots exhibited similar changes in Se and S content in response to the increasing selenate concentrations, mineral contents in three wheat lines were examined. Like in shoots, a gradual increase in Se levels was observed in roots of all three lines examined following addition of up to 10 μM Na_2SeO_4 (Fig. 3A). The application of 5 or 10 μM Na_2SeO_4 also significantly increased S content although the enhancement was to less extent than that observed in shoots at the same concentration of selenate supplement (Fig. 3B). Similar observation is also reported in other studies of barley [8] and corn [33].

We also evaluated Se and S content in grains following 5 μM Na_2SeO_4 supplement. Se supplement is effective in enhancing grain Se level (Fig. 3C). Unlike leaf tissues, wheat grain Se content has low genetic variation [34, 35]. Consistent with previous reports, the three wheat lines exhibited less than 20% variation in Se content (Fig. 3C). While the selenate application enhanced S content in both shoots and roots among the wheat lines examined, the S content in grains decreased when plants were treated with 5 μM Na_2SeO_4 (Fig. 3D). The slight decrease of S in the grains could be due to a competition between S and Se to translocate into this organ.

3.3. Effect of Se on the kinetics parameters of S uptake

Increasing selenate supplement was found to dramatically enhance S content in shoots of these wheat lines (Fig. 2C). Stimulation of S uptake by selenate is proposed to be due to increase S uptake [6]. Considering the importance of S to plant growth, we evaluated the kinetics parameters as K_m , V_{max} and C_{min} for S uptake to try to explain this synergistic effect of Se and S.

The kinetics parameters obtained did not provide an explanation for the effect of low concentrations of selenate supplement in stimulating S uptake in wheat plants. The S K_m , the Michaelis constant that is related to the external concentration of the element that permits half of the V_{max} [25], did not show significant difference between the selenate treatments and control, while the selenite treatment increased the K_m value (Fig. 4). The increase of K_m indicates low affinity of the element at the absorption site, hence lower uptake of S and uptake velocity with selenite at 5 μM . The result also provides an explanation for the observed and previously reported lower efficiency of uptake of selenite than selenate [9, 36, 10].

The S V_{max} , the maximum influx, decreased when plants were treated with 20 μM Na_2SeO_4 and 5 μM Na_2SeO_3 (Fig. 4). The low V_{max} for the velocity of uptake of S indicates less quantities of S being up taken by the plants.

The value of S C_{min} , the ion concentration below which net influx of the ion breaks off, increased when plants were treated with 5 μM Na_2SeO_3 (Fig. 4). From the viewpoint of nutrient uptake capacity, it is desirable that plants have a low C_{min} value, hence they are able to uptake element in reduced availability.

3.4. Expression of genes related in S/Se transport

Selenate is taken up and metabolized via sulfate transport and assimilation pathways. To investigate the molecular basis underlying Se controlled increase of S and provide an explanation, the expression of genes involved in S transport and assimilation in the wheat plants treated with and without 10 μM Na_2SeO_4 was examined.

Sulfate transport from soil into roots and shoots is carried out by a family of sulfate transporters, which are divided in four distinct groups [37, 38]. qRT-PCR analysis of the *SULTR* family genes showed that the expression of all the sulfur transporter genes tested were significantly decreased in leaves of both wheat lines when plants were cultivated with 10 μM NaSeO_4 , with the exception of *SULTR1;2* for line 3 (Fig. 5A). By contrast, different expression patterns of these transporter genes were observed in roots (Fig. 5B). The expression of *SULTR1;1*, *SULTR1;3* and *SULTR4;1* were significantly increased in roots of the two wheat lines expose to 10 μM NaSeO_4 . No significant difference in the expression of *SULTR1;2* and *SULTR2;1* was observed between selenate treated and untreated root samples (Fig. 5B).

The *SULTR* family exhibits divergent functions [37, 38]. *SULTR1;1*, *SULTR1;2* and *SULTR1;3* are in group 1 and considered as high-affinity transporter in the plasma membrane. *SULTR1;1* and *SULTR1;2* are responsible for sulfate uptake from the soil into roots and their gene expressions were upregulated under sulfur deficiency [39]. However, *SULTR1;1* is the primary transporter during sulfate starvation and *SULTR1;2* is the more prominent one under normal sulfate nutrition.

SULTR1;3 is important for sulfate source-sink redistribution. In the wheat roots, significant upregulation of *SULTR1;1* and *SULTR1;3* were observed in selenate-treated sample comparing with controls. The results suggest that selenate treatment at low dosages mimics sulfate starvation to stimulate the expression of *SULTR1;1* and *SULTR1;3*, the genes that play important roles during sulfate limitation and redistribution, facilitating the increased sulfate uptake in the wheat lines. A similar result was also observed in broccoli plants grown in the nutrient solutions with and without Na₂SeO₄ supplement (Huang et al., unpublished data). By contrast, *SULTR1;2* in roots of the wheat lines did not respond to selenate treatment, likely due to that it is the more prominent transporter under normal sulfate supply. While the group 1 transporters are primarily expressed in roots, they are also detected in other tissues, suggesting their potential other functions in plants [40]. Reduced expression of *SULTR1;1*, *SULTR1;2* and *SULTR1;3* in shoots of these wheat lines following selenate treatment was observed. Whether such reduction is involved in the selenate-promoted S accumulation in shoots is unknown.

SULTR2;1 is in group 2 as lower affinity sulfate transporter. *SULTR2;1* is expressed in the central cylinder tissues and induced by S limitation, which is proposed to play a role in facilitating sulfate efflux to the xylem and long distance sulfate translocation [37, 38]. The expression of *SULTR2;1* was not affected wheat roots but decreased in shoots following selenate treatment, suggesting that the efflux of sulfate to the xylem is differently affected. While the exact functional roles of group 3 sulfate transporters are unknown and their expressions were not examined here, *SULTR4;1* is in group 4 that codes vacuolar sulfate exporters and is

found in the tonoplast membrane. Interestingly, *SULTR4;1* was upregulated in roots and suppressed in shoots of wheat lines treated with selenate. The different regulation of the *SULTR4;1* expression by selenate may mediate the remobilization of sulfate by facilitating its release from the vacuoles in root cells for translocation into shoots and retaining it within the vacuoles in shoot cells for high levels of S accumulation in shoots.

3.5. Expression of genes related to S/Se assimilation

In plant cells, part of sulfate is stored in the vacuole and other part is metabolized via the primary sulfate assimilation pathway [38]. Sulfate is first activated by ATP-sulfurylase (*APS*) and reduced by adenosine 5'-phosphosulfate reductase (*APR*) before incorporation with activated serine by serine acetyltransferase (*SAT*) into amino acid skeleton of *O*-acetylserine (*OAS*) to form cysteine catalyzed by *OAS* (thiol) lyase (*OASTL*).

The expression of genes including *APS1*, *APR2*, *SAT1;1*, *SAT2;1*, *OASTL2*, and *OASTL4* in the primary sulfate assimilation pathway was examined. qRT-PCR analysis showed that the expression of all the genes studied was significantly decreased in leaves of wheat lines when the plants were treated with 10 μ M Na_2SeO_4 (Fig. 6A). In roots, the expression of *APS1* was consistently up-regulated and *SAT1;1* was down-regulated in both wheat lines, while the other genes examined showed no significant difference or consistent changes in both lines (Fig. 6B).

APS1 and *APR2* are responsible for the majority of *APS* and *APR* activities in seedlings of plants [41]. Both *APS1* and *APR2* have been shown to control sulfate levels in Arabidopsis leaves [42, 43]. *APS1* and *APR2* were found to be the causative genes for two major quantitative trait loci responsible for the genetic variation of S content in Arabidopsis. The reduced expression of *APS1* and decreased *APR2* activity lead to reduced S assimilation and increased accumulation of sulfate in Arabidopsis leaves [42, 43]. A recent study reveals that *APR2* also govern Se accumulation in Arabidopsis employing the same molecular mechanism [41]. Indeed, *APR* has been shown to be a key regulatory point for sulfate assimilation in transgenic maize [44]. Consistent with their roles in negatively regulating sulfate levels in plants, the reduced expression of *APS1* and *APR2* in leaves of selenate-treated wheat lines could provide another molecular basis to explain the selenate-regulated increase of S level in the leaves of wheat lines.

3.6. Effect of selenate on the activity of CAT and APX enzymes

CAT and APX are enzymes involved in the antioxidant defense system of plants. The activity of antioxidant enzymes provides the plant tolerance to abiotic stresses. The dual effect of Se on plant growth is suggested to be due to its different influence on antioxidant enzyme activity. Low concentration of Se treatment increases plant growth as Se enhances the antioxidant enzyme activity, while high concentration may cause metabolic disturbances, suppressing plant growth due to its pro-

oxidative effects [30]. Hence, the effects of selenate application on the two antioxidant enzymes were evaluated.

CAT activity did not showed much difference between plants treated with or without 10 μM Na_2SeO_4 for all of the three wheat lines evaluated (Fig. 7A). By contrast, APX activity was significantly increased in these lines when the wheat plants treated with selenate (Fig. 7B). The data of increased APX and no effect in CAT activity when plants were treated with selenate is consistent with that reported previously [45]. Both enzyme activities are not affected by different dosages of selenite treatment.

4. Conclusions

The different concentrations and forms of Se exert divergent effects on plant growth and mineral content in shoots and roots of wheat cultivars. Both selenate and selenite supply promotes wheat shoot and root dry matter production at low dosage of around 5 μM . Interestingly, the increasing concentrations of selenate supply to 10 μM not only continuously increased Se content, but also raised S level in shoots of all the wheat lines examined. The increasing concentrations of selenite treatment had minimal effect on S level in roots.

While the short-term uptake kinetics study did not explain how low concentrations of selenate improved the S content in shoots, the stimulation of S content by selenate in wheat shoots appeared to be due to a combination of selenate-promoted expression of *SULTR1;1* and *SULTR1;3* in roots with enhanced capacity of uptake, reduced expression

of *SULTR4;1* to limit efflux of sulfate from the vacuoles, and reduced expression of *APS1* and *APR2* in leaves to decrease S assimilation.

Acknowledgements

We thank Dr. Mark Sorrelle for providing the wheat lines, Mr. Eric Craft for helping analyze mineral contents by ICP. P.F.B. is grateful to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for granting the doctorate scholarships (regular and sandwich program), CNPq and FAPEMIG for granting support. This work was partially supported by the USDA-ARS base fund. USDA is an equal opportunity provider and employer.

References

- [1] M.P. Rayman, M.P. Rayman, The argument for increasing selenium intake. *Proc. Nutr. Soc.* 61 (2002) 203–215.
- [2] E. Pilon-Smits, C. Quinn, Selenium metabolism in plants, in: R. Hell, R.R. Mendel, (Eds.), *Cell biology of metal and nutrients*, Berlin: Springer, 2010, pp. 225-241.
- [3] N. Terry, A.M. Zayed, M.P. De Souza, A.S. Tarun, Selenium in higher plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51 (2000) 401–432.
- [4] K.S. Dhillon, S.K. Dhillon, Distribution and management of seleniferous soils, *Adv. in Agron.* 79 (2003) 119-184.
- [5] S.M. Lyi, L.I. Heller, M. Rutzke, R.M. Welch, L. V Kochian, L. Li, Molecular and biochemical characterization of the selenocysteine Se-methyltransferase gene and Se-methylselenocysteine synthesis in broccoli, *Plant Physiol.* 138 (2005) 409–420.
- [6] P.J. White, H.C. Bowen, P. Parmaguru, M. Fritz, W.P. Spracklen, R.E. Spiby, et al., Interactions between selenium and sulphur nutrition in *Arabidopsis thaliana*, *J. Exp. Bot.* 55 (2004) 1927–1937.

- [7] T.G. Sors, D.R. Ellis, D.E. Salt, Selenium uptake, translocation, assimilation and metabolic fate in plants, *Photosynth. Res.* 86 (2005) 373–389.
- [8] R.L. Mikkelsen, H.F. Wan, The effect of selenium on sulfur uptake by barley and rice, *Plant Soil.* 121 (1990) 151–153.
- [9] S.J. Ramos, M. a. Rutzke, R.J. Hayes, V. Faquin, L.R.G. Guilherme, L. Li, Selenium accumulation in lettuce germplasm, *Planta.* 233 (2011) 649–660.
- [10] P.F. Boldrin, V. Faquin, S.J. Ramos, K.V.F. Boldrin, F.W. Ávila, L.R.G. Guilherme, Soil and foliar application of selenium in rice biofortification, *J. Food Compos. Anal.* 31 (2013) 238–244.
- [11] G.A. de Souza, J.G. de Carvalho, M. Rutzke, J.C. Albrecht, L.R.G. Guilherme, L. Li, Evaluation of germplasm effect on Fe, Zn and Se content in wheat seedlings, *Plant Sci.* 210 (2013) 206–213.
- [12] J.L. Hopper, D.R. Parker, Plant availability of selenite and selenate as influenced by the competing ions phosphate and sulfate, *Plant Soil.* 210 (1999) 199–207.
- [13] H.F. Li, S.P. McGrath, F.J. Zhao, Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite, *New Phytol.* 178 (2008) 92–102.

- [14] T. Leustek, Sulfate metabolism, in: C.R. Somerville, E.M. Meyerowitz (Eds), *The Arabidopsis Book*, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, USA, 2002.
- [15] K. Saito, Sulfur assimilatory metabolism. The long and smelling road, *Plant Physiol.* 136 (2004) 2443–2450.
- [16] M.J. Hawkesford, L.J. De Kok, Managing sulphur metabolism in plants, *Plant, Cell Environ.* 29 (2006) 382–395.
- [17] P.R. Shewry, Wheat, *J. Exp. Bot.* 60 (2009) 1537–1553.
- [18] FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, *FAO Statistical Yearbook 2013 World Food and Agriculture*, Rome, 2013.
- [19] G. Lyons, J. Stangoulis, R. Graham, High-selenium wheat: biofortification for better health., *Nutr. Res. Rev.* 16 (2003) 45–60.
- [20] P.J. White, M.R. Broadley, Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets—iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine, *New Phytol.* 182 (2009) 49–84.

- [21] J.J. Hart, R.M. Welch, W.A. Norvell, L.A. Sullivan, L.V. Kochian, Characterization of cadmium binding, uptake, and Translocation in Intact Seedlings of Bread and Durum Wheat Cultivars, *Plant Physiol.* 116 (1998) 1413–1420.
- [22] S.M. Lyi, X. Zhou, L. V Kochian, L. Li, Biochemical and molecular characterization of the homocysteine S-methyltransferase from broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*), *Phytochemistry.* 68 (2007) 1112–1119.
- [23] D.R. Hoagland, D.I. Arnon, The water-culture method for growing plants without soil, *Calif. Agr. Exp. Sta. Cir.* 347 (1950).
- [24] H.A. Ruiz, Estimativa dos parâmetros cinéticos Km e Vmax por uma aproximação gráfico matemática, *Revista Ceres*, 32 (1985) 79-84.
- [25] N. Claassen, S.A. Barber, A method for Characterizing the Relation between Nutrient Concentration and Flux into Roots of Intact Plants, *Plant Physiol.* 54 (1974) 564–568.
- [26] D.F. Ferreira, SISVAR : A Computer statistical analysis system, *Cienc. E Agrotecnologia.* 35 (2011) 1039–1042.
- [27] J.J. Rios, B. Blasco, M.A. Rosales, E. Sanchez-Rodriguez, R. Leyva, L.M. Cervilla, et al., Response of nitrogen metabolism in lettuce plants subjected to different doses and forms of selenium, *J. Sci. Food Agric.* 90 (2010) 1914–1919.

- [28] S.J. Ramos, V. Faquin, L.R.G. Guilherme, E.M. Castro, F.W. Ávila, G.S. Carvalho, et al., Selenium biofortification and antioxidant activity in lettuce plants fed with selenate and selenite, *Plant, Soil Environ.* 56 (2010) 584–588.
- [29] B. Guerrero, M. Llugany, O. Palacios, M. Valiente, Dual effects of different selenium species on wheat, *Plant Physiol. Biochem.* 83 (2014) 300–307.
- [30] H. Hartikainen, T. Xue, V. Piironen, Selenium as an anti-oxidant and pro-oxidant in ryegrass, *Plant Soil.* 225 (2000) 193–200.
- [31] Y.G. Zhu, E.A.H. Pilon-Smits, F.J. Zhao, P.N. Williams, A.A. Meharg, Selenium in higher plants: understanding mechanisms for biofortification and phytoremediation, *Trends Plant Sci.* 14 (2009) 436–442.
- [32] M.G. Lefsrud, D.A. Kopsell, D.E. Kopsell, W.M. Randle, Kale carotenoids are unaffected by, whereas biomass production, elemental concentrations, and selenium accumulation respond to, changes in selenium fertility, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 1764–1771.
- [33] Y.Z. Huang, Y. Hu, Y.X. Liu, Interactions Between Sulfur and Selenium Uptake by Corn in Solution Culture, *J. Plant Nutr.* 31 (2007) 43–54.

- [34] G.A. Souza, J.J. Hart, J.G. Carvalho, M.A. Rutzke, J.C. Albrecht, L.R.G. Guilherme, et al., Genotypic variation of zinc and selenium concentration in grains of Brazilian wheat lines., *Plant Sci.* 224 (2014) 27–35.
- [35] G.H. Lyons, G.J. Judson, I. Ortiz-Monasterio, Y. Genc, J.C.R. Stangoulis, R.D. Graham, Selenium in Australia: Selenium status and biofortification of wheat for better health, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 19 (2005) 75–82.
- [36] S. Sharma, A. Bansal, S.K. Dhillon, K.S. Dhillon, Comparative effects of selenate and selenite on growth and biochemical composition of rapeseed (*Brassica napus* L.), *Plant Soil.* 329 (2010) 339–348.
- [37] T. Gigolashvili, S. Kopriva, Transporters in plant sulfur, *Front. Plant Sci.* 5 (2014) 1-16.
- [38] H. Takahashi, S. Kopriva, M. Giordano, K. Saito, R. Hell, Sulfur assimilation in photosynthetic organisms: molecular functions and regulations of transporters and assimilatory enzymes, *Annu. Rev. Plant Biol.* 62 (2011) 157–184.
- [39] P. Buchner, C.E.E. Stuiver, S. Westerman, M. Wirtz, R. Hell, M.J. Hawkesford, et al., Regulation of sulfate uptake and expression of sulfate transporter genes in *Brassica oleracea* as affected by atmospheric H₂S and pedospheric sulfate nutrition., *Plant Physiol.* 136 (2004) 3396–3408.

- [40] F.W. Smith, M.J. Hawkesford, P.M. Ealing, D.T. Clarkson, P.J. Vanden Berg, a R. Belcher, et al., Regulation of expression of a cDNA from barley roots encoding a high affinity sulphate transporter., *Plant J.* 12 (1997) 875–884.
- [41] D.-Y. Chao, P. Baraniecka, J. Danku, A. Koprivova, B. Lahner, H. Luo, et al., Variation in sulfur and selenium accumulation is controlled by naturally occurring isoforms of the key sulfur assimilation enzyme APR2 across the *Arabidopsis thaliana* species range. *Plant Physiol.* 166 (2014) 1593–1608.
- [42] A. Koprivova, M. Giovannetti, P. Baraniecka, B.R. Lee, C. Grondin, O. Loudet, et al., Natural variation in the ATPS1 isoform of ATP sulfurylase contributes to the control of sulfate levels in *Arabidopsis*., *Plant Physiol.* 163 (2013) 1133–1141.
- [43] O. Loudet, V. Saliba-Colombani, C. Camilleri, F. Calenge, V. Gaudon, A. Koprivova, et al., Natural variation for sulfate content in *Arabidopsis thaliana* is highly controlled by APR2., *Nat. Genet.* 39 (2007) 896–900.
- [44] M.N. Martin, M.C. Tarczynski, B. Shen, T. Leustek, The role of 5'-adenylylsulfate reductase in controlling sulfate reduction in plants, *Photosynth. Res.* 86 (2005) 309–323.

[45] M. Hasanuzzaman, M.A. Hossain, M. Fujita, Selenium-induced up-regulation of the antioxidant defense and methylglyoxal detoxification system reduces salinity-induced damage in rapeseed seedlings, *Biol. Trace Elem. Res.* 143 (2011) 1704–1721.

Table 1
Wheat lines used in this study

ID	Line	Type
1	Yorkstar	SWW
2	Opata	HWS
3	Stoa	HRS
4	Red Fife Facultativi	HRS
5	Medina	SWW
6	Caledonia	SWW
7	Otsego	SRW

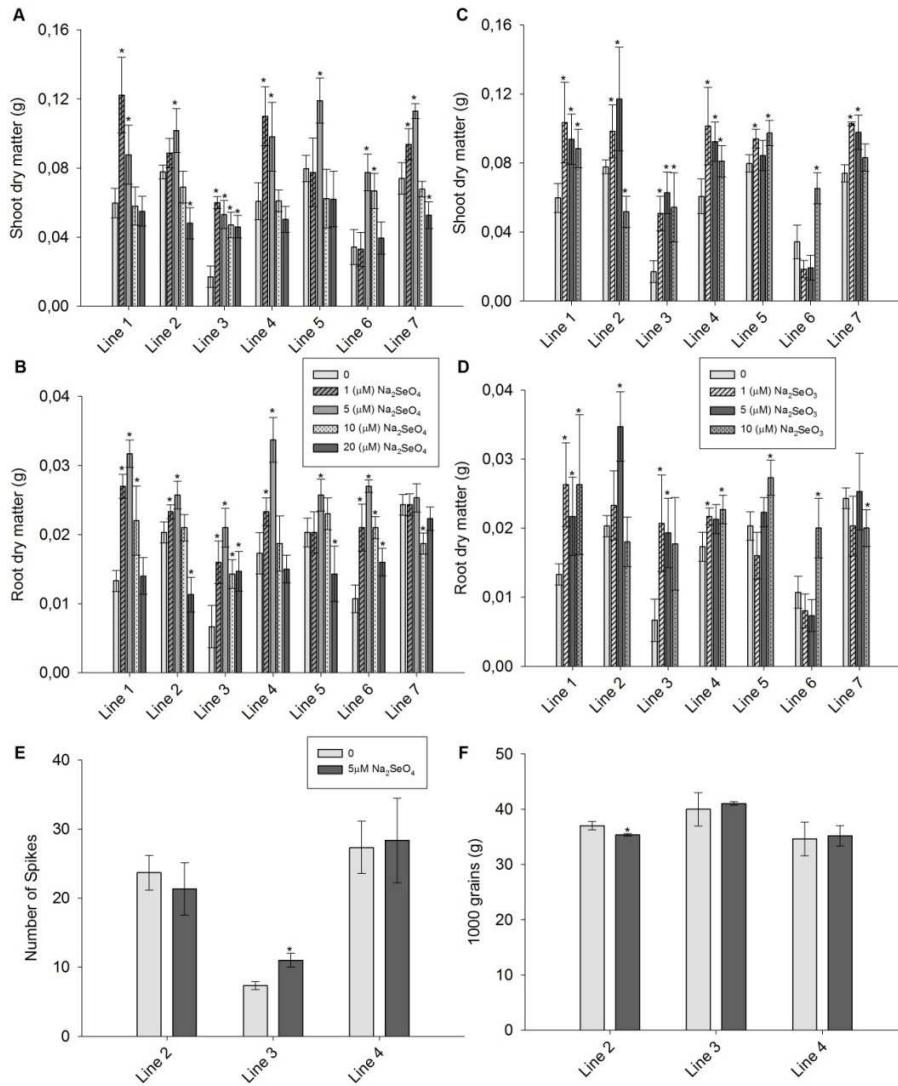


Fig. 1. Shoot dry matter production under selenate (A) and selenite (C) application. Root dry matter production under selenate (B) and selenite (D) application. Number of spikes (E) and weight of 1000 grains (F). Error bars indicate standard error of the mean (SEM) ($n = 4$). Asterisks

(*) indicate significant difference between plants treated and non-treated with selenate ($p \leq 0,05$).

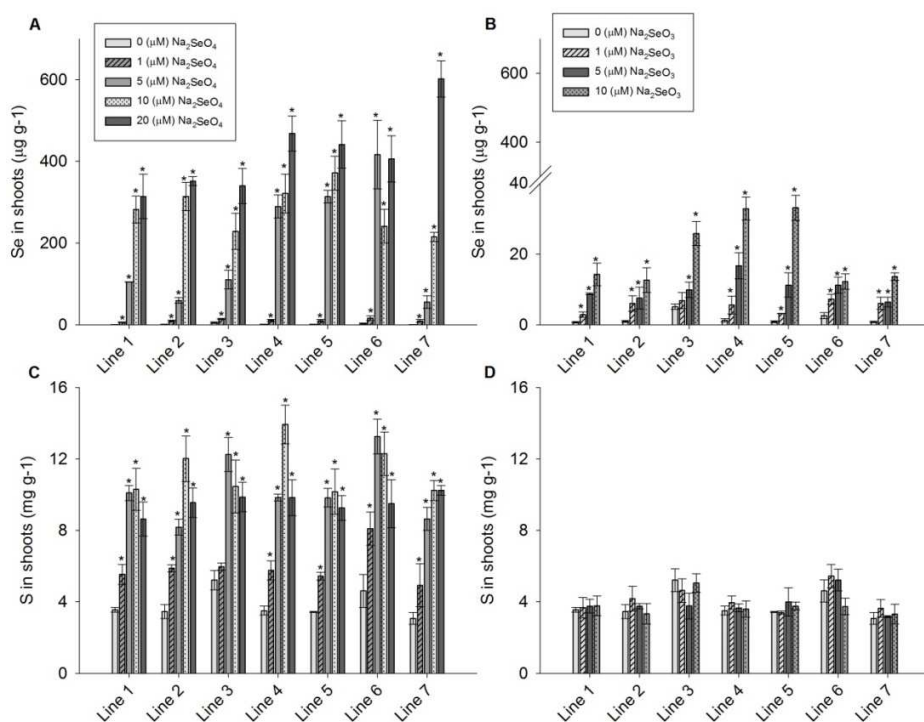


Fig. 2. Selenium content in shoots under selenate (A) and selenite (B) application. Sulfur content in shoots under selenate (C) and selenite (D) application. Error bars indicate standard error of the mean (SEM) ($n = 4$). Asterisks (*) indicate significant difference between plants treated and non-treated with selenium ($p \leq 0,05$).

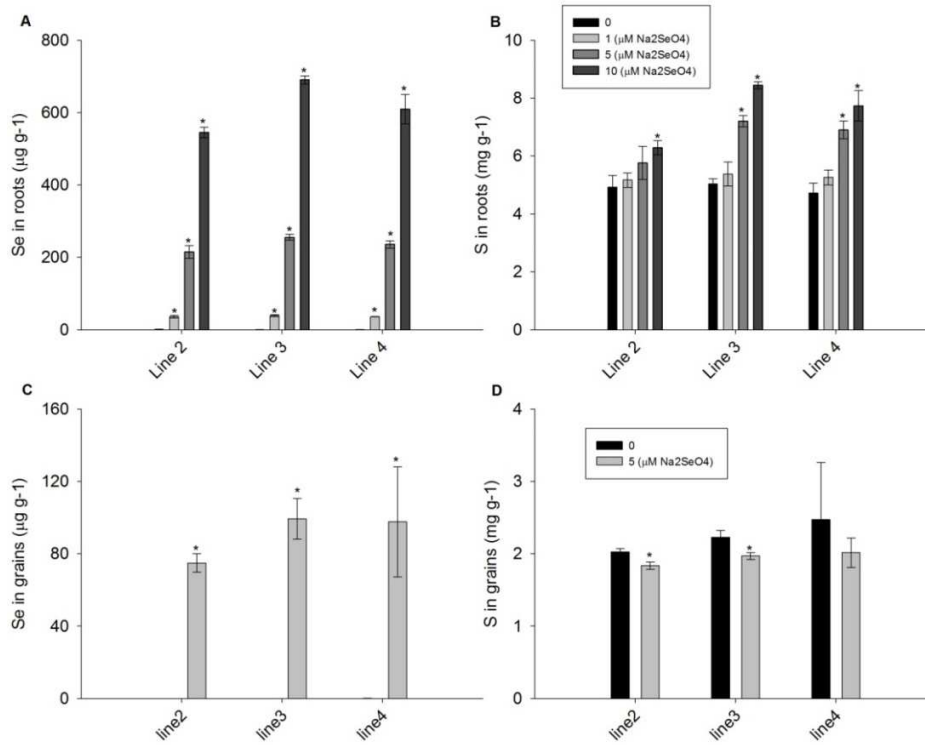


Fig. 3. Selenium (A) and Sulfur (B) content in roots from selenate application. Selenium (C) and Sulfur (D) content in grains from selenate application. Error bars indicate standard error of the mean (SEM) ($n = 4$). Asterisks (*) indicate significant difference between plants treated and non-treated with selenate ($p \leq 0.05$).

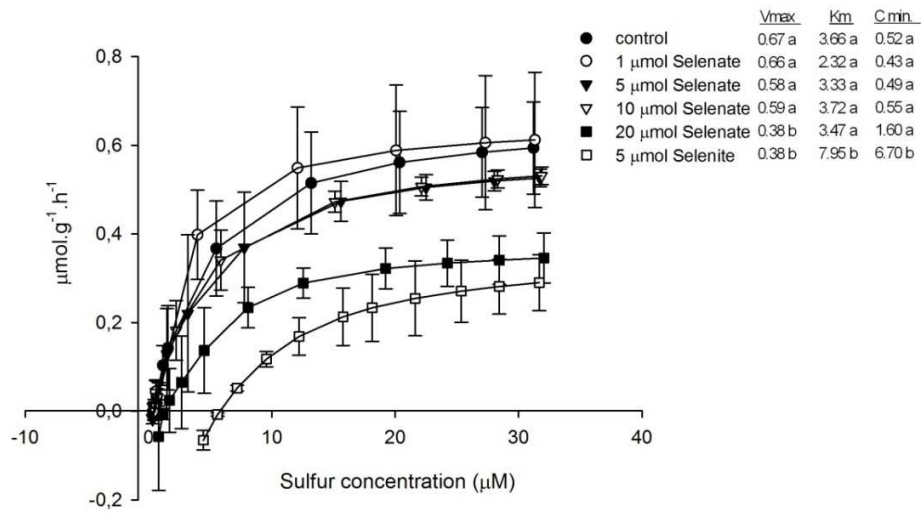


Fig. 4. Net influx of sulfur depending of Se dosages and forms. Error bars indicate standard error of the mean (SEM) ($n = 4$). The kinetic parameter in the column with the same letter indicates no significant difference by Scott-Knott's test ($p \leq 0.05$).

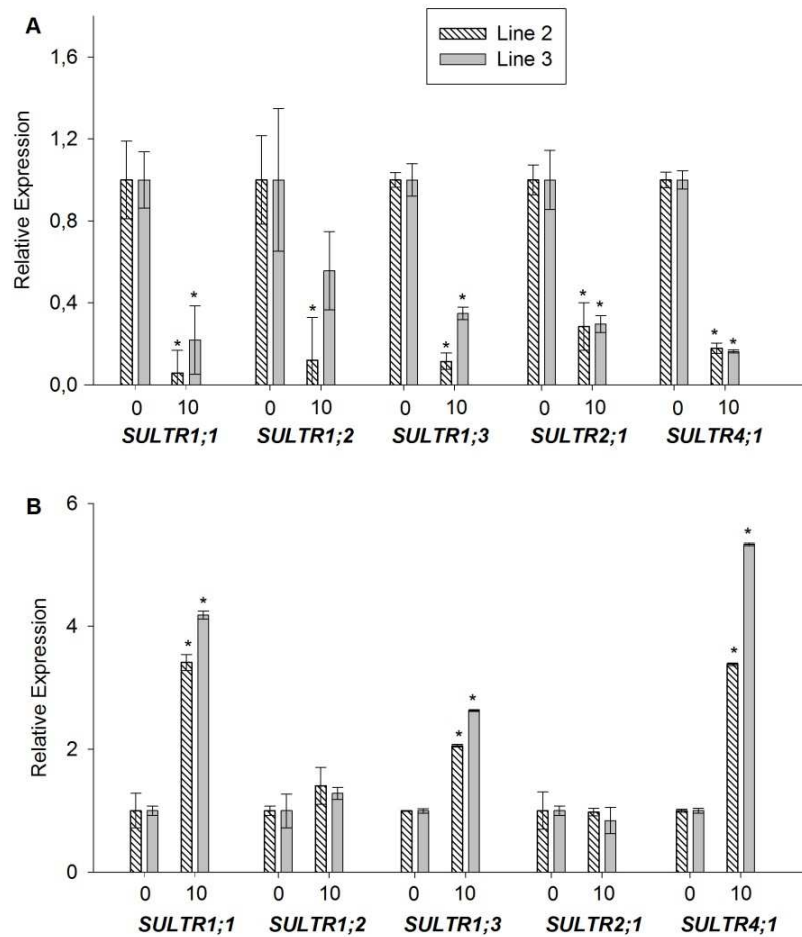


Fig.5. Relative expression of genes involved in S transport in two wheat accessions in leaves (A) and roots (B). Transcript levels of genes in leaves and roots of wheat cultivars treated (10 μM Na_2SeO_4) or non-treated with Se were measured by qRT-PCR. Data are means of three technical trials with two biological repeats. Asterisks (*) indicate significant difference between plants treated and non-treated with selenate, respectively ($P < 0.05$; $n = 3$).

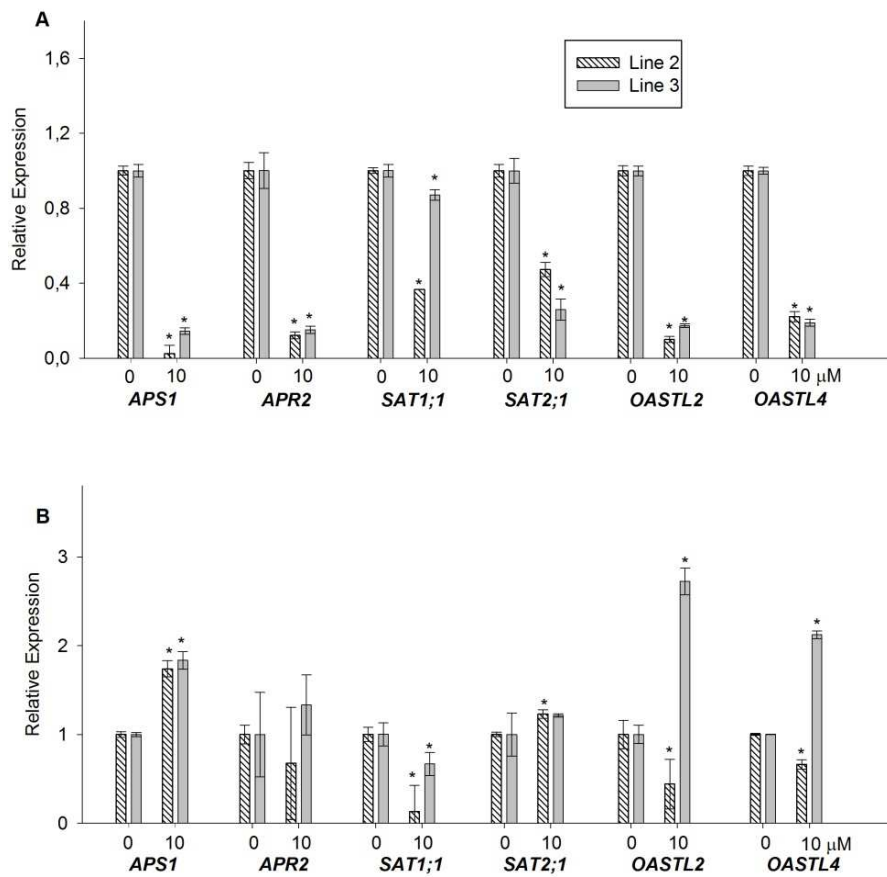


Fig. 6. Relative expression of genes involved in S assimilation in two wheat accessions in leaves (A) and roots (B). Transcript levels of genes in leaves and roots of wheat cultivars treated (10 μM Na_2SeO_4) or non-treated with Se were measured by qRT-PCR. Data are means of three technical trials with two biological repeats. Asterisks (*) indicate significant difference between plants treated and non-treated with selenate, respectively ($P < 0.05$; $n = 3$)

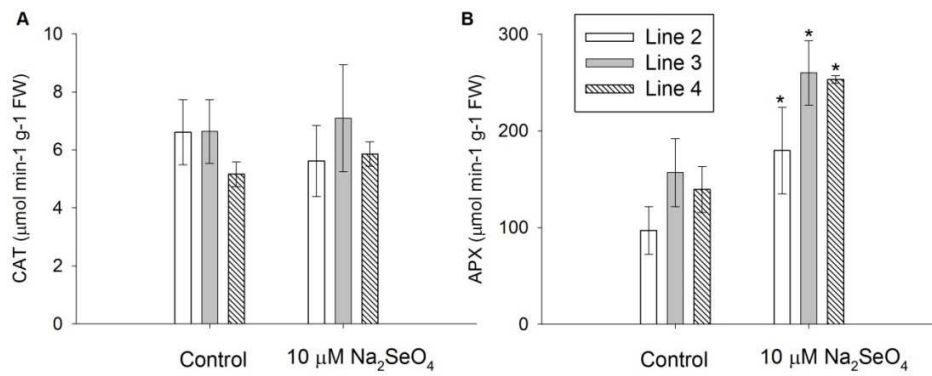


Fig. 7. Enzyme activity of catalase (A) and ascorbate peroxidase (B) in three accessions of wheat. Error bars indicate standard error of the mean (SEM) ($n = 4$). Asterisks (*) indicate significant difference between plants treated and non-treated with selenate ($p \leq 0,05$).