

**Centro de Investigación en Alimentación
y Desarrollo, A. C.**

**BIOFORTIFICACIÓN CON SELENIO:
INFLUENCIA EN LA CAPACIDAD
ANTIOXIDANTE Y CALIDAD NUTRICIONAL
DEL FRIJOL**

POR:

MARTHA ARACELY HERMOSILLO CERECERES

TESIS APROBADA POR LA

UNIDAD CUAUHTÉMOC

FISIOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE LA ZONA TEMPLADA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORADO EN CIENCIAS

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten citas breves del material contenido de esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con autorización escrita del Director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD, A.C.).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, A.C., previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión, del director o directora de la tesis.

Dr. Ramón Pacheco Aguilar

Director General

APROBACIÓN

Los miembros del comité para revisar la tesis de Martha Aracely Hermosillo Cereceres, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias, dentro del posgrado de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Unidad CIAD-Cuauhtémoc.

Dr. Esteban Sánchez Chávez

Director de tesis

Dra. Graciela Dolores Ávila Quezada

Asesor

Dr. René Renato Balandrán Quintana

Asesor

Dra. Ana María Mendoza Wilson

Asesor

AGRADECIMIENTOS

A **Jesucristo**, rey y salvador de mi vida, por su amor y misericordia que vi día a día a lo largo de estos tres años.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**, por la beca otorgada para realizar mis estudios de doctorado.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**, por el financiamiento del proyecto de Ciencia Básica 081055, para el desarrollo de esta investigación.

Al **Centro de Investigación y Desarrollo, A.C.**, personal de la **Unidad Cuauhtémoc**.

Al **Centro de Investigación y Desarrollo, A.C., Unidad Delicias** por las facilidades y todo el apoyo para desarrollar el trabajo experimental de esta investigación.

Al Dr. **Esteban Sánchez Chávez**, director de tesis, por su acertada dirección, confianza y todo el apoyo para el desarrollo de esta investigación.

A la Dra. **Graciela Ávila Quezada**, por sus acertadas sugerencias y consejos en el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. **Ana María Mendoza Wilson**, por su apoyo en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. **René Balandrán Quintana**, por su apoyo en el desarrollo de este trabajo.

Al I.Q.Al. **Alexandro Guevara Aguilar**, del CIAD, Unidad Delicias, por su apoyo técnico en el análisis de muestras y por la amistad brindada.

Al M.C. **Ezequiel Muñoz Márquez**, del CIAD, Unidad Delicias, por su apoyo técnico en el análisis de muestras y por la amistad brindada.

A la I.Q.Al. **Hilda Karina Saenz**, del CIAD, Unidad Delicias, por el apoyo técnico y por la amistad brindada.

A la Lic. **Elva Cardona Covarrubias**, del CIAD, Unidad Delicias, por todo el apoyo administrativo del proyecto de investigación y por la amistad brindada.

A la Sra. **Dora María Delgado** y el Sr. **Omar Alpista**, por su amistad y por las palabras de aliento.

Al amor de mi vida, mi esposo **Adolfo Hernández**, por su apoyo, paciencia, amor y por todo lo que hizo para que llegara a término este trabajo.

A mis amados padres **Rubén Hermosillo y Concepción Cereceres**, por su amor y apoyo a lo largo de todo este tiempo.

A mi hermano **Tavo Hermosillo C.**, mi cuñada **Mari García**, mis amados sobrinos: **Sofi, Diego, Mar y Luisa**, por todo el amor y el apoyo demostrado en este tiempo.

A la familia **Hernández Martínez**, por todo su cariño y su apoyo en todo este tiempo.

A mi pastor **José Luis Ramírez y su esposa Armida Fuentes**, por sus oraciones, comprensión y apoyo.

A mis amadas amigas **Elva Portillo Gutiérrez y Maye Portillo Gutiérrez**, por su amistad, cariño y apoyo a lo largo de este tiempo de trabajo.

A mi querido amigo **Binyam Teklu**, por su amistad, cariño y oraciones en la etapa final de este trabajo.

A mi amiga **Erendira Corona M.**, por su amistad, cariño, apoyo y comprensión en este tiempo.

A mi amiga **Yamile Martínez**, por su amistad, cariño y todo el apoyo para concluir esta etapa, ejemplo de vida.

A mi amiga **Placida Guadalupe Medrano Barraza**, por su amistad, cariño y su ayuda.

DEDICATORIA

Al Rey de Reyes y Señor de Señores, **Jesucristo.**

Al amor de mi vida, **Adolfo Hernández.**

A mis padres, **Rubén Hermosillo y Concepción Cereceres.**

A mi hermano **Tavo.**

A mi cuñada **Mari García.**

A mis amados sobrinos: **Sofi, Diego, Mar y Luisa.**

A mi hermano **Lázaro.**

A mi **mamá Julia.**

CONTENIDO

Índice de figuras	IX
RESUMEN	X
INTRODUCCIÓN	1
Biofortificación con micronutrientes de cultivos agrícolas.....	2
Biofortificación con selenio	4
Estrategias de biofortificación con selenio	6
Química del selenio	7
Selenio en los suelos	9
Ruta de asimilación de selenio en las plantas	10
Biofortificación con selenio e inducción de la capacidad antioxidante .	14
Biofortificación con selenio y su influencia en el metabolismo oxidativo en las plantas	20
Selenio en la calidad nutricional de los cultivos	28
Influencia del selenio sobre el metabolismo nitrogenado de las plantas	29
Selenio en la nutrición y la salud humana	30
Hipótesis	34
Objetivo general	34
Objetivos particulares	34
LITERATURA CITADA	35
RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN	49
CAPÍTULO I. Ionome variation in bean plant growth under different Se forms and application rates	50

CAPÍTULO II. Biofortification and distribution pattern of selenium bean: response to selenate and selenite	56
CAPÍTULO III. Nitrogen metabolism, biomass and yield response of green bean plants to selenium fertilization	70
CAPÍTULO IV. Impacto de la fertilización con selenio en la actividad de enzimas detoxificadoras de H ₂ O ₂ en plantas de frijol	92
CAPÍTULO V. Biofortificación con selenio y su efecto en la capacidad antioxidante del frijol	115
CAPÍTULO VI. Biofortificación agronómica con selenio y su efecto en la calidad nutricional del frijol	135
Conclusiones finales	152

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estabilidad termodinámica de las formas de selenio en relación al potencial redox y pH	8
Figura 2. Esquema simplificado de la ruta de asimilación y eliminación del Se en las plantas	11
Figura 3. Estructura básica de un fenol	14
Figura 4. Estructura básica de los flavonoides	15
Figura 5. Fórmula estructural del glutatión	17
Figura 6. Fórmula estructural del ascorbato	18
Figura 7. Ciclo ascorbato-glutatión	23
Figura 8. Estructura de la enzima superóxido dismutasa	24
Figura 9. Estructura de la enzima catalasa	25
Figura 10. Estructura de la enzima glutatión peroxidasa	26
Figura 11. Efecto de la aplicación de selenio en frijol	29
Figura 12. Selenocompuestos más comunes y su fórmula estructural	32
Figura 13. Ciclo metabólico de selenometionina, selenocisteína y selenio inorgánico.....	33

RESUMEN

La deficiencia de selenio en el mundo es un problema actual de salud pública, por lo que la estrategia de biofortificación de cultivos es una herramienta útil para dar solución a tan grave situación. Actualmente, se han realizado investigaciones en diferentes cultivos para conocer el efecto del selenio (Se) en diferentes aspectos, sin embargo, poco es lo que se ha investigado en el cultivo del frijol. El presente trabajo de investigación está dividido en seis capítulos:

Capítulo 1) Variación del ionome en plantas de frijol crecidas bajo diferentes formas y dosis de aplicación de Se. En este apartado se encontró un antagonismo de los nutrientes esenciales con el Se en sus dos formas y diferentes dosis de aplicación en el cultivo de frijol, ya que tanto el selenato como el selenito disminuyeron la concentración de estos nutrientes en las hojas de frijol. Sin embargo, ninguno de estos nutrientes se redujo por debajo del rango de suficiencia para este cultivo. Con respecto a los macronutrientes esenciales, el Se favoreció solo las concentraciones de Ca, sin llegar a valores tóxicos para la planta. Por esta razón, podemos afirmar que la fertilización con Se para el cultivo del frijol es adecuada, ya que no causó disminución en el rendimiento en las dosis apropiadas. Finalmente, para aumentar la concentración de Se en frijol bajo programas de biofortificación es una estrategia promisoría en los sistemas de cultivo, con el fin de aumentar la ingesta de Se en la población general y proporcionar los beneficios que ofrece este nutriente en la salud humana.

Capítulo 2) Biofortificación y patrón de distribución del Se en frijol: respuesta a selenato y selenito. La aplicación de Se en forma de selenito a 40 μM fue la mejor dosis para biofortificar la planta de frijol, ya que favoreció el crecimiento de la planta

(biomasa) y el aumento de la concentración biodisponible de Se en la semilla. Respecto al selenato, la mejor dosis fue la de 20 μM . Además, las dosis altas de selenito causaron fitotoxicidad en frijol, provocando una drástica disminución en la biomasa. Finalmente, se concluye que es viable implementar un programa de biofortificación de frijol con Se, ya que dicho nutriente se concentró principalmente en la semilla.

Capítulo 3) Metabolismo nitrogenado, biomasa y rendimiento de frijol en respuesta a la fertilización con Se. En este apartado se encontró que la aplicación de Se en forma de selenato, tuvo un efecto positivo sobre el metabolismo nitrogenado y el aumento de biomasa, por lo tanto, el Se puede ser incorporado en un programa de biofortificación con micronutrientes. El selenato fue menos tóxico que el selenito. Las dosis de 20 μM de selenato y 40 μM de selenito fueron las más adecuadas para biofortificar el frijol. Los resultados encontrados indican que, la mayor producción de biomasa se presentó en la dosis de 160 μM de selenato, de la misma forma la mayor concentración de nitrógeno se presentó al aplicar la forma química de selenato, debido a que el selenito fue más tóxico para la planta, ya que redujo la biomasa en un 63%. Sin embargo, la mayor actividad de la enzima nitrato reductasa (NR) se observó en la dosis de 160 μM de selenito. Respecto a la mayor concentración de proteínas solubles, ésta se presentó al aplicar selenito.

Capítulo 4) Impacto de la fertilización con Se en la actividad de enzimas detoxificadoras de H_2O_2 en plantas de frijol. Los resultados obtenidos indicaron que la actividad de las enzimas detoxificadoras de H_2O_2 en plantas de frijol cv. Strike es dependiente de la forma química de aplicación de Se. El selenito, desde la dosis de 20 μM disminuyó la biomasa y el rendimiento, además incrementó la actividad de la superóxido dismutasa. Además, estas dosis incrementaron la actividad de la catalasa, sin

embargo parece que no es eficiente en la detoxificación de H_2O_2 en presencia de Se, dado el aumento también en la producción de H_2O_2 . Por otro lado, el selenato disminuyó el rendimiento hasta la dosis de 160 μmol e incrementó la actividad de la enzima glutatión peroxidasa llegando a su máxima actividad en 160 μmol , por lo que resultó menos tóxico que el selenito.

Capítulo 5) Biofortificación con Se y su efecto en la capacidad antioxidante del frijol.

Los resultados encontrados indicaron que para el cultivo del frijol es favorable la fertilización con Se ya que incrementó el rendimiento en las dosis de 40 μM de selenito y 20 μM de selenato. Además, el mayor incremento en el contenido de compuestos fenólicos fue en la dosis de 160 μM de selenito, en un 33% en relación al control, con lo que también aumentó la capacidad antioxidante de las semillas de frijol, dado que en esta dosis se tuvo el mayor incremento del poder reductor y por consecuencia el aumento de la capacidad antioxidante.

Capítulo 6) Biofortificación agronómica con Se y su efecto en la calidad nutricional del frijol.

En este apartado se encontró un efecto favorable de la biofortificación con Se en el cultivo de frijol para el aumento en rendimiento. Las mejores dosis fueron 40 μM de selenito y 20 μM de selenato, ya que incrementaron el contenido de Fe, Zn y Se en la semilla, por lo que aumentaron el valor nutritivo del cultivo. Potencialmente, el consumo de 100 gramos del frijol biofortificado con 40 μM de selenito aportaría 6.74 mg de Fe, 2.2 mg de Zn, 2,020 mg de K y 13.8 mg de Se. Por otro lado, el consumo de 100 gramos de frijol biofortificado con 20 μM de selenato aportaría 8.47 mg de Fe, 2.4 mg de Zn, 1,210 mg de K y 5.1 mg de Se. Respecto a esto, el consumo de 100 gramos de la muestra control aportaría menos nutrientes: 6.64 mg de Fe, 2.07 mg de Zn, 1,110 mg de

K, sin aporte de Se. Por lo tanto, el frijol es un cultivo viable para incorporar el Se a la dieta de poblaciones humanas que presenten deficiencias de dicho elemento, por su gran capacidad de acumular este elemento en la parte comestible de la planta (semilla). En base a los resultados obtenidos en la presente investigación es viable implementar un programa de biofortificación con Se en frijol, ya que este micronutriente se concentró más en las semillas (parte comestible de la planta), permitiendo mejorar su calidad nutricional y capacidad antioxidante.

INTRODUCCIÓN

La biofortificación de cultivos agrícolas con micronutrientes es el proceso mediante el cual se incrementa el contenido de elementos esenciales en la parte comestible de la planta mediante la fertilización tradicional o con técnicas de biotecnología, para el beneficio del ser humano. La técnica utilizada más eficiente y con mejores resultados es la fertilización tradicional, ya que a un bajo costo se han obtenido excelentes resultados y se ha beneficiado a importantes sectores de la población. Uno de los organismos que ha trabajado bajo este concepto de biofortificación de cultivos es Harvest Plus, y mencionan que esta técnica es factible y además puede tener un impacto biológico, sin comprometer las características agronómicas del cultivo. Sin embargo, el reto es lograr que los consumidores acepten cultivos biofortificados, pero con el desarrollo de mercados y la creación de demanda, esto puede convertirse en una realidad.

Entre los nutrientes que se han utilizado recientemente en programas de biofortificación destaca el selenio (Se), debido a su importancia para la salud humana. Estudios recientes indican que bajo una adecuada ingesta de este nutriente se puede prevenir diferentes tipos de cáncer, además tiene influencia sobre el buen funcionamiento del sistema inmunológico. Sin embargo, actualmente existe una deficiencia del consumo de Se afectando a gran parte de la población mundial, esto es debido a que los suelos contienen poca cantidad del elemento o que no está disponible para las plantas y debido a que la fuente principal de este nutriente es mediante el consumo de vegetales el problema está latente. El contenido de Se en las plantas depende de la forma química aplicada y además de la capacidad que tenga la planta para tolerarlo en sus tejidos sin llegar a presentar síntomas de toxicidad, ya

que el Se en grandes cantidades puede actuar como prooxidante. En base al contenido de Se que toleran las plantas sin presentar síntomas de toxicidad se clasifican en hiperacumuladoras, acumuladoras y no acumuladoras.

Las plantas pueden absorber el Se del suelo principalmente como selenato o selenito, no obstante, pocos trabajos son los que han evaluado las dos fuentes de Se y sus efectos en un mismo cultivo. Además, se debe tener en cuenta también el patrón de distribución del Se en cada cultivo ya que bajo el concepto de biofortificación el propósito es que el nutriente se concentre en la parte comestible. Por lo tanto, es necesario detallar lo más posible el efecto de dicho nutriente en todas las funciones del cultivo en particular, ya que el Se aún no es considerado esencial para las plantas. El presente trabajo de tesis describe la biofortificación con Se (selenato y selenito) y su influencia en la capacidad antioxidante y calidad nutricional del fruto de frijol.

BIOFORTIFICACIÓN CON MICRONUTRIENTES DE CULTIVOS AGRÍCOLAS

La deficiencia de micronutrientes como hierro (Fe), zinc (Zn), selenio (Se) y el yodo (I) es un problema de salud pública, que afecta a más de un tercio de la población mundial (Who, 2002). El número de personas que tienen deficiencia en la ingesta de Se se estima entre 0.5 y 1 millón de personas en todo el mundo (Combs, 2001). Deficiencias en calcio (Ca), magnesio (Mg) y cobre (Cu) se presentan en un tercio de la población, principalmente en los países en vías de desarrollo (White y Broadley, 2005; Who, 2006). La malnutrición por deficiencia de micronutrientes tiene grandes consecuencias socio-económicas, lo que resulta en el aumento de la mortalidad, el poco crecimiento, poco desarrollo y baja capacidad de aprendizaje en

los bebés y niños, además de pérdida de la capacidad para trabajar de los adultos, lo cual a su vez debilita el crecimiento económico e induce pobreza (Who, 2002). Lo anterior ha sido ocasionado en parte por la agricultura moderna que impulsa principalmente un mayor rendimiento a menor costo, pero sin darle importancia a la calidad nutricional (Sands *et al.*, 2009).

La biofortificación con micronutrientes de los cultivos básicos se presenta como una herramienta útil para combatir esta problemática. Esta alternativa busca incrementar el contenido de nutrientes en los cultivos mediante técnicas de fertilización, fitomejoramiento tradicional o fitomejoramiento asistido con biotecnología (Welch y Graham, 1999; Welch, 2002; Welch y Graham, 2004; Nestel *et al.*, 2006; Johns y Eyzaguirre, 2007).

La biofortificación tiene múltiples ventajas, como la inversión una sola vez para desarrollar semillas fortificadas, los costos recurrentes son bajos y el germoplasma puede ser compartido. Además, el sistema de cultivos biofortificados es un medio viable para hacer llegar alimentos fortificados a las personas con acceso limitado a ellos, especialmente la gente desnutrida de zonas rurales relativamente remotas (Nestel *et al.*, 2006). Sin embargo, requiere que la investigación agrícola tenga vínculos directos con los sectores de salud y nutrición humana (Bouis *et al.*, 2003).

Por lo anterior, tres puntos principales son los que se requieren para implementar un programa de biofortificación con éxito: 1) que los cultivos biofortificados deben ser de alto rendimiento y rentable para el agricultor; 2) los cultivos biofortificados deben mostrar eficacia para disminuir la problemática de malnutrición en los seres humanos; 3) el cultivo biofortificado debe ser aceptado por

los agricultores y los consumidores en la región de destino. La organización Harvest Plus, que es no gubernamental y se enfoca en el desarrollo de cultivos biofortificados con selenio ha abordado todos estos temas (Hotz *et al.*, 2007). Un punto importante a tomar en cuenta para la optimización de los programas de biofortificación es el procesamiento que se le da a los cultivos después de la cosecha, ya que cultivos como el trigo se consumen después de un proceso de molienda (White y Broadley, 2005) lo que pudiera modificar las concentraciones biodisponibles de los nutrientes en el cultivo. Además, las concentraciones de algunos nutrientes como el Se y el azufre (S) se encuentran en mayor proporción en el embrión de la semilla; otros como el Fe, Cu y Zn se encuentran principalmente en el salvado (Gregorio *et al.*, 2000; Lyons *et al.*, 2005).

Biofortificación con selenio

El contenido de Se en los alimentos es generalmente determinado por la cantidad biodisponible de Se en los suelos. La concentración de Se en la mayoría de los suelos del mundo es baja (0.01-2.0 mg Se kg⁻¹), con un promedio de 0.4 mg Se kg⁻¹; sin embargo, existen suelos seleníferos con concentraciones mayores a 1,200 mg Se kg⁻¹ (Fordyce, 2005).

Para mejorar la problemática de la deficiencia de Se en la población mundial, lo necesario es biofortificar cultivos básicos en la dieta humana, como el trigo, maíz, arroz, frijol y papa. Las concentraciones de Se en estos cultivos se puede aumentar a través de la fertilización tradicional (Euroola *et al.*, 1991; Gupta y Gupta 2002; Lyons *et al.*, 2004, 2005; Turakainen *et al.*, 2004), teniendo beneficios como lo indican Pennanen *et al.* (2002) y Hu *et al.* (2003), quienes encontraron que el Se incrementa el crecimiento en el cultivo de la lechuga y el té verde, respectivamente. También se

ha encontrado que el Se incrementa el crecimiento y la calidad del tubérculo de papa (Turakainen, 2007). En zacate ryegrass se ha demostrado que promueve el crecimiento de las raíces (Cartes *et al.*, 2010).

La adición de Se en plantas de fresa ayudó a disminuir el estrés ocasionado por los rayos UV-B, además de que hubo un mayor crecimiento (Heijari *et al.*, 2006). En plantas hiperacumuladoras como la *Brassica juncea*, el Se las protege contra el ataque de hervíboros y de hongos (Hanson *et al.*, 2003).

En lo referente a la adición de Se al cultivo de frijol, son pocos los trabajos que se han realizado. Arvy (1989) indica que después de la absorción por tres horas de Se en forma de selenito por la raíz de las plantas de frijol, este es eficientemente traslocado a la parte aérea, encontrando además que la captación se incrementa cuando las plantas se mantienen en obscuridad o cuando la solución nutritiva se suministró con glucosa, por lo que indica que la traslocación del selenito es mediante un transporte activo.

Posteriormente, Arvy (1993) aplicó selenato y selenito reportando lo siguiente: después de 3 horas de absorción de selenato más del 50% se traslocó a los órganos aéreos. Cuando las raíces se sumergen en una solución de hidroxilamina el nivel de Se se redujo en un 80% en toda la planta, lo que sugiere que la absorción de selenato requiere energía. Respecto al selenito, una parte importante del Se se había acumulado en las raíces, mientras que una pequeña fracción se trasmite a los órganos aéreos. Este porcentaje se redujo en 20% cuando las plantas se transfirieron a una solución de hidroxilamina, lo que sugiere que parte del selenito entro a las raíces en forma pasiva.

Smrkolj *et al.* (2007) aplicaron selenato en plantas de frijol bajo dos métodos diferentes (fertilización foliar y fertilización vía hidropónica) durante 10 días, encontrando que en las semillas obtenidas de la fertilización foliar se acumuló más Se ($2 \mu\text{g g}^{-1}$ p.s. contra $0.6 \mu\text{g g}^{-1}$ p.s.). Además, encontraron SeMeSeCis y Semet y dos especies desconocidas de Se.

En un estudio reciente en frijol, Aggarwal *et al.* (2011) aplicaron selenato hasta los diez días de edad de las plántulas. Encontraron que en bajas dosis (1 y 2 ppm) el selenato incrementó el crecimiento de los rebrotes y raíces, mientras que en dosis altas (4 y 6 ppm) el crecimiento se vio inhibido, lo que se relacionó al daño en la membrana, baja respiración celular, disminución en el contenido de clorofila y agua en las hojas. Además, indican que el efecto fitotóxico del Se podría ser debido a la reducción de los niveles endógenos de prolina y el aumento en el estrés oxidativo.

Estrategias de biofortificación con selenio

La concentración de Se en los tejidos vegetales puede ser aumentada mediante la fertilización en el suelo o aplicaciones foliares. El mejor ejemplo de la eficacia de esta técnica para incrementar el contenido de Se en los cultivos es Finlandia (en donde desde 1984 se ha incluido Se en los fertilizantes) y Nueva Zelanda (Eurola *et al.*, 1989, 1991, 2004; Lyons *et al.*, 2003; Hartikainen, 2005), lo anterior ha ayudado a incrementar la ingesta diaria de Se en la población de ese país de 25 a 60 μg en 1974 a un promedio de 90 μg en 1992 (Reilly, 1998).

La aplicación de Se vía fertilización foliar en pasto y forrajes ha sido aplicada con éxito, mostrando resultados favorables en el contenido de Se en la dieta de animales y humanos (Gissel-Nielsen, 1998; Gupta y Gupta, 2002; Broadley *et al.*, 2006).

Respecto al mejoramiento genético para aumentar el contenido de Se, se menciona que la variabilidad genética hereditaria no es lo suficientemente eficiente para acumular Se en los cultivos (Graham *et al.*, 2001; Rayman, 2002; Lyons *et al.*, 2003, 2005).

El uso de la biotecnología mediante la manipulación de genes puede ser otra alternativa para incrementar el contenido de Se en las plantas. Bañuelos *et al.* (2005) mencionan que la sobreexpresión de la enzima ATP sulfurilasa y de genes involucrados en la síntesis del glutatión aumenta la acumulación de Se en plantas transgénicas de mostaza de indias (*Brassica juncea* L.). En plantas de *Arabidopsis*, la sobreexpresión de la enzima selenocisteína-liase incrementa la tolerancia al Se y aumenta en un 50% su acumulación (Hoewyk *et al.*, 2005).

Química del selenio

El Se y el azufre (S) son nutrientes químicamente similares, por lo que su absorción y asimilación en las plantas es a través de vías comunes (Eapen y D'Souza, 2005). Las valencias más comunes del Se son -2, 0, +2, +4, +6, que se presentan como Se^{2-} (selenuro), Se^0 (selenio elemental), $\text{Se}_2\text{O}_3^{2-}$ (tioselenato), SeO_3^{2-} (selenito) y SeO_4^{2-} (selenato) (Sors *et al.*, 2005).

La acumulación de Se y su vía metabólica no solo depende de la especie de planta, sino también de la forma química suministrada (Zayed *et al.*, 1998; Ximenex-Embun *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2008).

El Se es muy móvil en condiciones oxidantes, pero su movilidad disminuye con la disminución del pH (Terry *et al.*, 2005; Broadley *et al.*, 2006). Además, la termodinámica y las condiciones redox pueden cambiar las distribuciones de

equilibrio entre las diferentes formas de Se (Figura 1), no obstante, en el medio ambiente estas condiciones y sus cambios dependen de la cinética de las reacciones. Similarmente, las formas orgánicas de Se también son abundantes en el medio ambiente, son sensibles al pH y las condiciones redox de su entorno. Por otra parte, la distribución geológica, química y bioquímica del Se, tienden a ser análogas al S (Ralston *et al.*, 2008). Un conocimiento a fondo de la estructura química del Se es de vital importancia para un mayor beneficio en sistemas de producción. Sin embargo, la caracterización de las formas de Se más comúnmente usadas en la agricultura (selenato y selenito de sodio) es escasa (Barraza *et al.*, 2011).

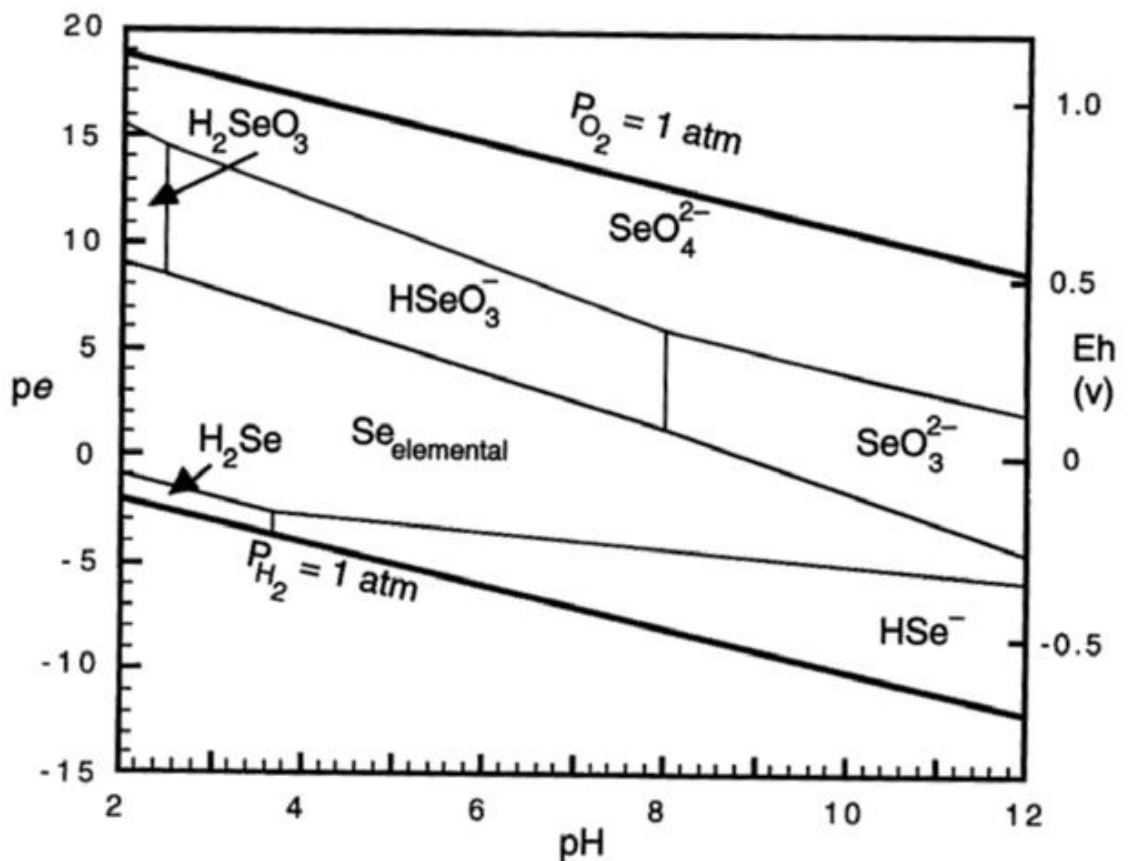


Figura 1. Estabilidad termodinámica de las formas de selenio en relación al potencial redox y pH (Drever, 1997).

Selenio en los suelos

El Se es uno de los elementos que se encuentran en mayor cantidad en la corteza terrestre, en gran parte se encuentra asociado con el azufre (S). Se estima que en la corteza terrestre hay entre 0.05 y 0.09 mg kg⁻¹ de Se. Sin embargo, la distribución geográfica de este elemento en los suelos es muy variada (Wang y Gao, 2001). Igualmente, la proporción de Se soluble en agua y biodisponible para las plantas no necesariamente se correlaciona con el nivel de Se total en el suelo (Zhao *et al.*, 1993). La concentración y forma presente del Se en los suelos está determinada principalmente por su geoquímica (White *et al.*, 2007; Rayman *et al.*, 2008).

Los factores que intervienen en la movilidad del Se en los suelos son el pH, condiciones redox y el contenido de materia orgánica. Un aumento en el pH del suelo aumenta la absorción de Se por la planta (Johnsson, 1991).

Las formas más comúnmente aplicadas de Se son el selenito y el selenato, sin embargo, estudios recientes indican que menos del 20% del Se aplicado en el suelo en forma de selenato es absorbido por el cultivo (Keskinen *et al.*, 2009).

En México, en la zona norte, existen suelos con concentraciones altas de este elemento (Reilly, 2006). Sin embargo, el Altiplano mexicano es una zona deficiente de Se (Ramírez-Bribiesca *et al.*, 2001), donde se localiza el estado de Zacatecas, la principal zona productora de frijol. Debido a que existe una insuficiencia de Se en los suelos, probablemente exista una deficiencia en el consumo de Se en la dieta mexicana. El aporte a través del consumo de frijol es de 180 µg kg⁻¹, que resulta insuficiente para cubrir el requerimiento diario (Wyatt *et al.*, 1996).

Ruta de asimilación del selenio en plantas

Las plantas pueden tomar el Se como selenato, selenito, o como compuestos orgánicos de Se como selenocisteína (SeCis) y selenometionina (SeMet) (White *et al.*, 2004; White *et al.*, 2007). El selenito y el selenato son las dos formas químicas más comunes presentes en el ambiente. El selenito tiene más afinidad de adsorción y el selenato es más soluble en agua (Hamilton, 2003), ambas formas son fácilmente absorbidas por las plantas (Shardendu *et al.*, 2003; Bañuelos y Lin, 2005).

En la Figura 2 se esquematiza el proceso de asimilación del Se. El Se puede entrar como selenato en las células de la raíz a través de los transportadores de sulfato en la membrana plasmática (Terry *et al.*, 2000; White *et al.*, 2004) o como selenito. La absorción del selenito aún no está claramente evidenciada, sin embargo, se sugiere que la absorción de selenito es un proceso activo parcialmente mediado por los transportadores de fosfato (Li *et al.*, 2008). Después de que el selenato es absorbido por las plantas es transportado a los plástidos o puede permanecer en el citoplasma, donde es asimilado por la vía de asimilación del S. En esta ruta de asimilación el selenato es activado por la ATP sulfurilasa para formar Adenosin 5'fosfoselenato, que se reduce a selenito en la presencia de Adenosin 5'fosfosulfato reductasa y posteriormente a seleniuro a través de una vía no enzimática en la presencia de glutatión. El seleniuro se asimila en SeCis y SeMet. Estos seleno aminoácidos se incorporan a las proteínas de forma no específica y pueden causar toxicidad a la planta. Los selenoaminoácidos también pueden ser eliminados mediante la volatilización al convertirse en dimetilseleniuro (DMSe) (Lu *et al.*, 1995; Ip *et al.*, 2002; Ellis y Salt, 2003), siendo el principal producto de la fitovolatilización (Dumont *et al.*, 2006), mediante la enzima sulfato metil metionina

hidrolasa que convierte la selenometilmetionina a DMSe (Berken *et al.*, 2002; Turakainen, 2007). En las plantas acumuladoras, la SeCis es metilada y se convierte en dimetildiseleniuro para ser volatilizado (Terry *et al.*, 2000).

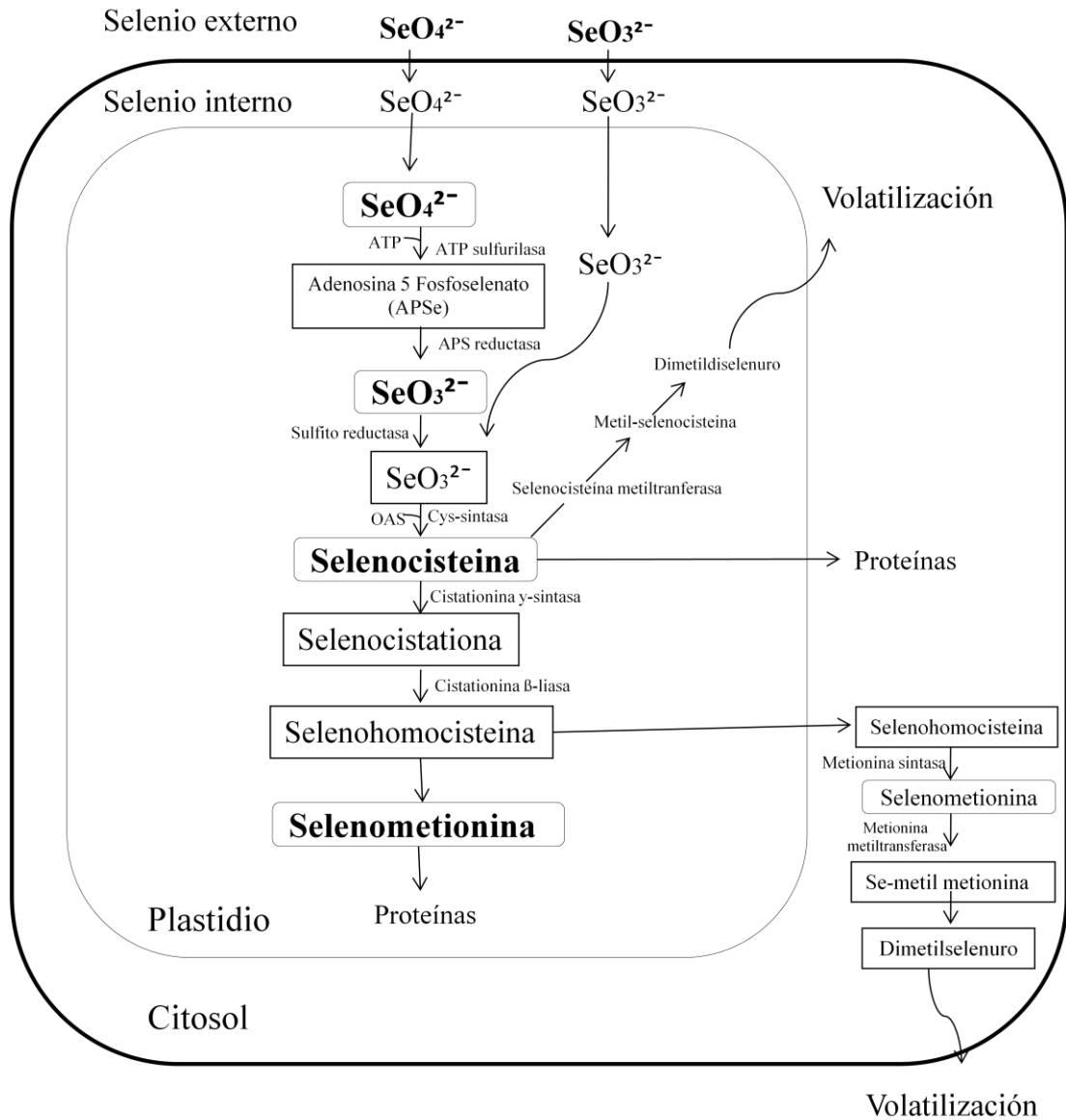


Figura 2. Esquema simplificado de la ruta de asimilación y eliminación del Se en plantas (Terry *et al.*, 2000; Sors *et al.*, 2005).

La habilidad de las plantas para volatilizar el Se está influenciada por la concentración de Se en el medio de cultivo, la especie de Se suministrada y la concentración de sulfato en comparación al selenato (Terry *et al.*, 2000). La tasa de

volatilización de Se varía considerablemente entre las especies de plantas (Duckart *et al.*, 1992). Sin embargo, para algunas especies no existe diferencia entre la tasa de volatilización de Se cuando se suministra selenito o selenato como es el caso de los árboles de sauces (*Salix atsudana* Koidz \times *alba* L. y *Salix babylonica* L.) (Yu y Gu, 2008). Mientras que en cultivos como el brócoli, mostaza de India, remolacha azucarera y arroz, se volatiliza más selenito que selenato (Zayed *et al.*, 1998).

Respecto a la absorción, Yu y Gu (2008) reportaron que en los árboles de sauces (*Salix atsudana* Koidz \times *alba* L. y *Salix babylonica* L.) se absorbió más rápidamente el selenato que el selenito, sin embargo, indican que aunque el selenato fue más eficientemente absorbido por la planta, el selenito tuvo mayor movilidad en su interior.

La respuesta de las plantas al Se puede variar dependiendo de la concentración del nutriente en el suelo y de su concentración. En general, las plantas se pueden dividir en tres grupos: no acumuladoras de Se, indicadoras de Se, y acumuladoras de Se. Las plantas no acumuladoras rara vez contienen más de 100 $\mu\text{g Se g}^{-1}$ de materia seca, las indicadoras pueden contener hasta 1,000 $\mu\text{g Se g}^{-1}$ de materia seca, mientras que las acumuladoras pueden contener hasta 4,000 $\mu\text{g Se g}^{-1}$ de materia seca, cuando crecen en suelos ricos en Se, por ejemplo en áreas del oeste de Estados Unidos (Bell *et al.*, 1992; Feist y Parker, 2001). Las especies de plantas con capacidad para tolerar grandes cantidades de Se son usadas para fitorremediación en lugares contaminados con Se (Terry *et al.*, 2000; Berken *et al.*, 2002). Sin embargo, la mayoría de las plantas cultivadas tienen una baja tolerancia a altas concentraciones de Se. Generalmente, las plantas solo contienen bajos niveles como 25 $\mu\text{mol Se g}^{-1}$ y son consideradas como no acumuladoras (Hasanuzzaman *et al.*,

2010). En plantas acumuladoras de Se, la selenocisteína puede ser metilada y convertida a dimetilseleniuro. La metilselenocisteína no es incorporada a las proteínas y puede ser volatilizada como dimetilseleniuro, lo que es un paso importante para evitar la toxicidad de Se (Sors *et al.*, 2005).

Cuando se suministra selenato a las plantas no hiperacumuladoras, acumulan Se principalmente como selenato, y sólo una pequeña fracción (aproximadamente 5%) como Se orgánico (C-Se-C) (De Souza *et al.*, 1998) y los más altos niveles de Se se encuentran en los tejidos vasculares (Freeman *et al.*, 2006). En plantas hiperacumuladoras se acumula Se principalmente como metilSeCis en las hojas o en las vacuolas de las células epidérmicas (Freeman *et al.*, 2006). Por lo tanto, el metabolismo y el patrón de distribución es diferente entre las plantas no hiperacumuladoras y las acumuladoras. Se cree que el Se es distribuido dentro de la planta como selenato y/o como compuestos orgánicos a través del floema (White *et al.*, 2007).

La toxicidad de Se es originada primeramente por la generación de radicales superóxido, la sustitución del Se por el S en las proteínas (sustitución de la cisteína y metionina por selenoanálogos) y por la inhibición de la metilación, lo que significa que actúa como prooxidante (Zayed *et al.*, 1998; Terry *et al.*, 2000; Spallholz y Hoffman, 2002). La absorción de altas concentraciones de Se por la raíz de las plantas provoca síntomas de lesiones como retraso en el crecimiento, clorosis, marchitez y secado de las hojas, disminución de la síntesis de proteínas, lo que origina estrés oxidativo y lleva a la muerte prematura de la planta (Mengel y Kirkby, 1987).

BIOFORTIFICACIÓN CON SELENIO E INDUCCIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

Los antioxidantes son sustancias orgánicas que cuando están presentes en bajas concentraciones en comparación con las de un sustrato oxidable, retrasa significativamente o previenen la oxidación de ese sustrato (Halliwell y Gutteridge, 1999). Entre los compuestos con capacidad antioxidante destacan los compuestos fenólicos, carotenoides, ascorbato, glutatión y Se (Shao *et al.*, 2008).

Compuestos fenólicos

El grupo de los compuestos fenólicos comprende aproximadamente 8,000 compuestos presentes en la naturaleza. Estos tienen una estructura común: un anillo fenol, que es un anillo aromático que lleva al menos un sustituyente hidroxilo (Figura 3).

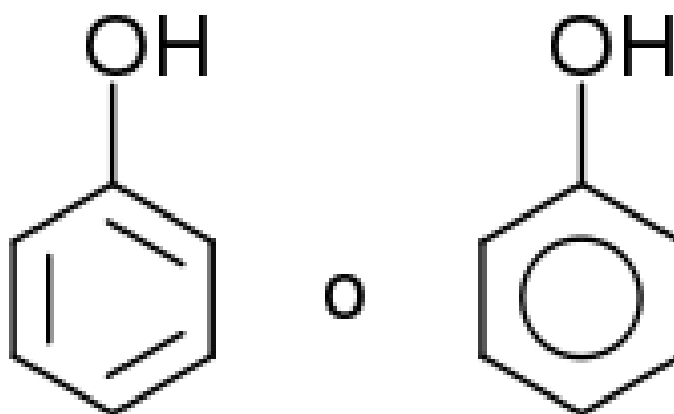


Figura 3. Estructura básica de un fenol

Los compuestos fenólicos tienen efectos benéficos en la salud, principalmente mediante la actividad antioxidante (Fan *et al.*, 2002). Estos compuestos remueven los radicales libres, además secuestran metales, activan enzimas antioxidantes y pueden

inhibir oxidasas (Heim *et al.*, 2002). Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios en las plantas, derivados de la fenilalanina. Las plantas y los alimentos contienen una gran variedad de derivados fenólicos, incluyendo fenoles simples, fenilpropanoides, derivados del ácido benzoico, flavonoides, estilbenos, taninos, lignanos y ligninas, suberina y cutina. Los compuestos fenólicos son esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas, actúan como antipatógenos, contribuyen a la pigmentación, y son atrayentes de polinizadores. Además, pueden proteger a las plantas de la luz UV y son antioxidantes naturales. Estos compuestos presentan actividad antimutagénica y anticancerígena, además tienen un papel muy importante en la salud debido a que se han asociado con la reducción de enfermedades crónico-degenerativas (Rui, 2004).

Flavonoides

Los flavonoides son parte de los polifenoles y poseen al menos 2 subunidades fenólicas (Figura 4). Los compuestos que tienen 3 o más subunidades fenólicas se denominan taninos (Robbins, 2003).

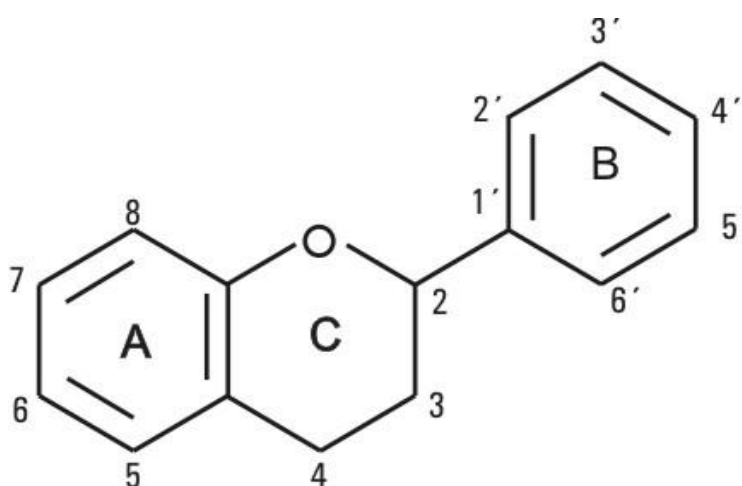


Figura 4. Estructura básica de los flavonoides

Los flavonoides comprenden alrededor de 4,000 compuestos y son derivados fenólicos. Estos poseen actividad antioxidante y capacidad para capturar radicales libres (Vinson *et al.*, 1995). La actividad antioxidante depende de la estructura individual y del número de hidroxilos sustituyentes, así como, del peso molecular. En los flavonoides, esta característica se asocia con la presencia en la molécula de grupos orto dihidroxi en el anillo B, un doble enlace entre el C₂ y C₃ en conjunto con la posición 4-oxo en el anillo C, y grupos 3-5 hidroxilo, y la función 4 – oxo en los anillos A y C (Velioglu *et al.*, 1998).

Principales compuestos fenólicos de la semilla de frijol

La semilla de frijol contiene diferentes compuestos fenólicos, principalmente se encuentran en la cascarilla y el color de ésta se encuentra determinado por la presencia y concentración de polifenoles tales como flavonoides glicosilados, taninos condensados y antocianinas (Choung *et al.*, 2003; Romani *et al.*, 2004; Salinas *et al.*, 2005).

Los taninos son producto de la condensación de fenoles simples y tienen una variedad de estructuras moleculares. Ellos están generalmente divididos en proantocianidinas hidrolizables y condensadas (polímeros de flavan-3-oles) (Haslam, 1989). Los taninos son compuestos biológicamente activos y pueden tener efectos nutricionales benéficos o adversos. Los taninos condensados, compuestos fenólicos predominantes en semillas leguminosas, se encuentran ampliamente en lentejas, granos de soya coloreados, y frijoles comunes (Takahata *et al.*, 2001; Troszynska *et al.*, 2002; Beninger y Hosfield, 2003; Amarowicz *et al.*, 2004). Estos compuestos son los principales componentes de la cascarilla de frijol, han sido reportados en todos los colores de semilla, desde el negro, rojo, café, amarillo, crema e inclusive en el

blanco; sin embargo, no está muy clara la relación entre el contenido de taninos y la actividad antioxidante del frijol. Inicialmente se asociaba una mayor actividad en los frijoles negros y más coloridos, contradictorio a lo reportado por Beninger y Hosfield (2003) que encontraron la mayor actividad antioxidante en frijol blanco.

Glutation

El glutatión (Figura 5) es un tripéptido (α -glutamyl, cisteína, glicina), que se ha encontrado en sitios celulares como citosol, cloroplastos, retículo endoplasmático, vacuolas y mitocondria. Este participa en el control de los niveles de H_2O_2 , ya que el cambio de glutatión reducido (GSH) a glutatión oxidado (GSSG) se da durante la degradación del H_2O_2 en el ciclo ascorbato glutatión, su función antioxidante es más evidente bajo condiciones de estrés (Foyer *et al.*, 2001; Millar *et al.*, 2003; Foyer y Noctor, 2005).

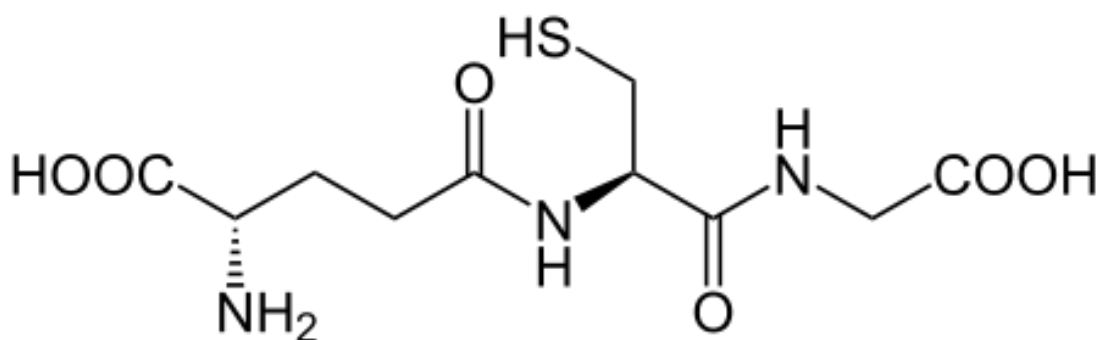


Figura 5. Fórmula estructural del glutatión (GSH)

Además, tiene otras funciones como: transporte y almacenamiento de S, control del estado redox de la célula, protección de los grupos tiol de las proteínas, participación en el ciclo celular, inducción de expresión de genes de defensa ante patógenos, percepción y respuesta ante estrés abiótico actuando como sensor celular,

producción de fitoquelatinas, detoxificación de metales pesados y xenobióticos (Foyer y Noctor, 2005).

Ascorbato

Es un compuesto reductor hidrosoluble muy abundante en las plantas. En su estado reducido actúa como cofactor de enzimas antioxidantes que destruyen diferentes tipos de especies reactivas de oxígeno dentro del ciclo ascorbato-glutathion, por lo que reduce el daño oxidativo en una función sinérgica con otros antioxidantes (Foyer y Noctor, 2005). Así, tiene un papel muy importante en el crecimiento, el desarrollo, y en la respuesta al estrés en las plantas (Debolt *et al.*, 2007).

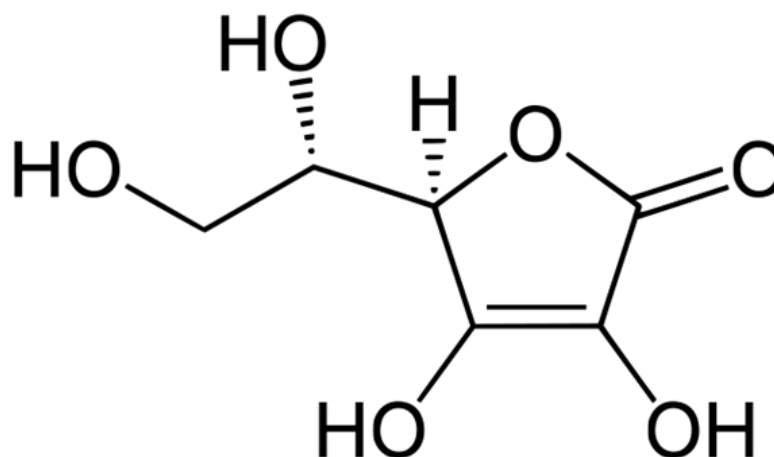


Figura 6. Fórmula estructural del ascorbato (AsA)

Selenio

Este elemento no ha sido clasificado como un nutriente esencial para las plantas; no obstante, diversas investigaciones han demostrado que es favorable,

debido a que actúa como un promotor de la capacidad antioxidante que inhibe la peroxidación lipídica en zacate ryegrass (*Lolium perenne*) (Hartikainen *et al.*, 2000). Estudios recientes han demostrado que el Se tiene efectos positivos en la acumulación de carbohidratos en el cultivo de papa (Turakainen *et al.*, 2004). Además, estudios recientes han demostrado que el Se promueve el crecimiento y desarrollo de las plantas e incluso puede incrementar su capacidad antioxidante cuando se encuentran sujetas a varios tipos de estrés (Peng *et al.*, 2002; Djanaguiraman *et al.*, 2005). El Se actúa como antioxidante al inhibir la peroxidación de lípidos, como lo mencionan Hartikainen *et al.* (2000) en un trabajo realizado en zacate ryegrass a concentraciones de 0.1 a 1.0 mg Se Kg⁻¹. Otros autores como Djanaguiraman *et al.* (2005) mencionan que mejora el crecimiento y la capacidad antioxidante en el cultivo de soya, ayudando en el estrés oxidativo causado por la radiación UV. Ramos *et al.* (2010) indican que en el cultivo de la lechuga a dosis bajas el Se actúa como antioxidante y además mejora el crecimiento.

En otros reportes se sugiere que el aumento de la capacidad antioxidante al aplicar Se a los diferentes cultivos es debido al incremento de compuestos como el tocoferol y compuestos fenólicos (Hartikainen *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2001; Ríos *et al.*, 2008).

Xu *et al.* (2003) mencionan que en plantas de té verde la adición de Se incrementa el contenido de ácido ascórbico por lo que aumenta la capacidad antioxidante. En el cultivo de arroz de igual forma la adición de Se incrementa la capacidad antioxidante (Xu y Hu, 2004).

Biofortificación con selenio y su influencia sobre el metabolismo oxidativo en plantas

En condiciones fisiológicas, las principales especies químicas de oxígeno presentes en la célula son: oxígeno triplete ($^3\text{O}_2$), oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), agua (H_2O) e hidróxido (OH^-) (Foyer y Noctor, 2009). El O_2 es una molécula relativamente estable capaz de generar especies mucho más reactivas a través de reacciones de transferencia de energía o de electrones. Las especies de oxígeno reactivo (ROS) son moléculas con moderada (H_2O_2 , O_2^-) o elevada ($\text{OH}\cdot$, $^1\text{O}_2$) reactividad química que se generan durante el metabolismo celular y pueden dañar a distintas biomoléculas. El radical $\text{OH}\cdot$ se origina por reducción del H_2O_2 por cantidades traza de Fe^{2+} y Cu^+ (reacciones Fenton). Este radical $\text{OH}\cdot$ es extremadamente oxidante y reacciona instantáneamente con moléculas próximas, ya que tiene capacidad para iniciar la peroxidación de lípidos. En cambio, el radical O_2^- ó el H_2O_2 no causan daño oxidativo por sí mismos, pero sí intervienen en la formación de ROS y especies de nitrógeno reactivo (RNS) con mayor capacidad oxidante (Halliwell y Gutteridge, 2007). El O_2 oxida a diferentes biomoléculas en función de su localización intracelular, daña las membranas e incluso interviene en la inducción de la muerte celular (Ryter y Tyrrell, 1998) al provocar estrés oxidativo.

El estrés oxidativo es un desequilibrio en el balance pro-oxidante-antioxidante, donde la ventaja la tiene el primero, lo que puede originar un daño (Sies, 1991). Este desequilibrio puede dar como resultado una disminución de los niveles de antioxidantes, por ejemplo las mutaciones que afectan a la actividad de las enzimas de defensa antioxidante como SODCuZn o GSH-Px, también puede ser por

las toxinas que destruyen las defensas antioxidantes o el aumento de la producción de especies reactivas (Halliwell y Whiteman, 2004).

La producción de especies reactivas en plantas se produce principalmente en la fotosíntesis, respiración, metabolismo celular, respuesta a estrés y fijación de N_2 . En los cloroplastos el fotosistema I reduce el O_2 a radical O_2^- a través de la reacción de Mehler (fotorreducción de O_2) y el fotosistema II genera radicales O_2^- y $OH\cdot$. En el interior de los cloroplastos se puede producir O_2 cuando la clorofila transfiere la energía de excitación al O_2 (Halliwell y Gutteridge, 2007). Posteriormente, en las mitocondrias durante la respiración se reduce el O_2 a H_2O a través de la cadena de transporte de electrones. Esta reducción puede tener lugar por un mecanismo tetravalente (citocromo *c* oxidasa, oxidasa alternativa) y del 1 al 2% del O_2 consumido genera ROS. Esto ocurre principalmente en los complejos I (NADH deshidrogenasa) y III (ubiquinol-citocromo *c* oxidorreductasa) de la membrana interna mitocondrial. La superóxido dismutasa-Mn (SODMn) mitocondrial actúa sobre el radical O_2^- para transformarlo en H_2O_2 , que se reduce por iones Fe^{2+} o Cu^+ a radicales $OH\cdot$ en reacciones tipo Fenton (Navrot *et al.*, 2007).

En los peroxisomas se produce H_2O_2 durante la fotorrespiración mediante la glicolato oxidasa, la β -oxidación de los ácidos grasos, y la dismutación del radical O_2^- por la SODMn y SODCuZn. El O_2^- se origina en la matriz por acción de la xantina oxidasa y en la membrana por un mecanismo dependiente de NADPH (Del Río *et al.*, 2006). La capacidad de producir y regular la liberación de ROS y RNS al citosol, así como la proliferación de peroxisomas en respuesta a diversos estreses y durante la senescencia, determinan que estos orgánulos desempeñen un papel clave

en la respuesta al estrés oxidativo en las plantas (Corpas *et al.*, 2001; Del Río *et al.*, 2002).

Además de los compuestos con capacidad antioxidante, las células vegetales también cuentan con un sistema antioxidante enzimático, donde participan principalmente las enzimas del ciclo ascorbato-glutation, la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutacion peroxidasa (GSH-Px). En el ciclo ascorbato-glutation se lleva a cabo en algunos orgánulos celulares como los cloroplastos, plastidios, mitocondrias y peroxisomas (Figura 7) (Mittova *et al.*, 2004). El objetivo de este ciclo es eliminar el H_2O_2 que utiliza como donador de electrones la Nicotinamida Adenín Dinucleótido fosfato reducido (NADPH). La primera enzima que actúa es la ascorbato peroxidasa (APX), la cual cataliza la reducción de H_2O_2 a agua utilizando el ascorbato reducido (AsA). El producto de esta reacción es el monodehidroascorbato (MDHA), el cual puede oxidarse espontáneamente a dehidroascorbato (DHA). El AsA puede ser regenerado a partir del MDHA por la enzima monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) con oxidación de la Nicotinamida Adenina reducido (NADH) o a partir del DHA por la dehidroascorbato reductasa (DHAR) utilizando el GSH como reductor, el GSH oxidado (GSSG) puede regenerarse por la acción de la enzima glutacion reductasa (GR) (Foyer y Noctor, 2009).

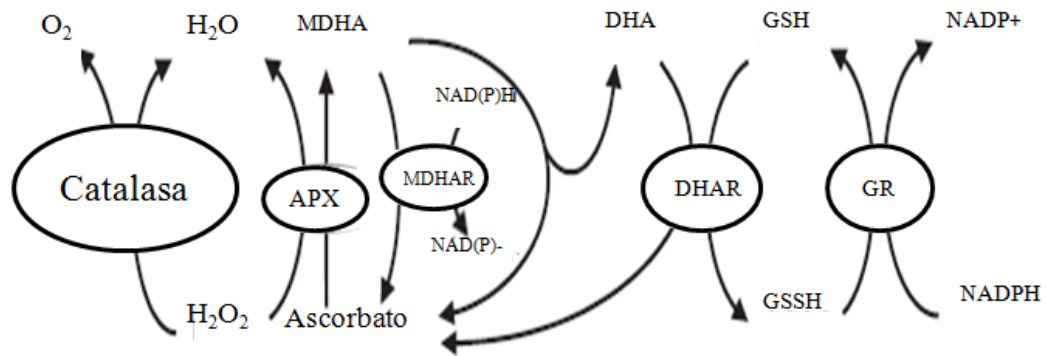
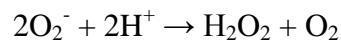


Figura 7. Ciclo ascorbato-glutation: participan enzimas como la ascorbato peroxidasa (APX), monodehidroascorbato reductasa (MDHAR), dehidroascorbato reductasa (DHAR), glutatión reductasa (GR) (Foyer y Noctor 2009).

Superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1)

Las SODs (Figura 8) son metaloenzimas que catalizan la dismutación del radical O₂⁻:



Es una metaloenzima encargada de la eliminación de O₂⁻ mediante una reacción de dismutación. Se han encontrado tres tipos de SODs, ya que utilizan diferente metal como cofactor: cobre y zinc (SODCuZn), manganeso (SODMn) o hierro (SODFe), los tres tipos de enzimas son sintetizadas en el citoplasma. Las SODCuZn se encuentran en los cloroplastos, peroxisomas y citosol, las SODMn en mitocondrias y peroxisomas, y las SODFe en cloroplastos (Alscher *et al.*, 2002).

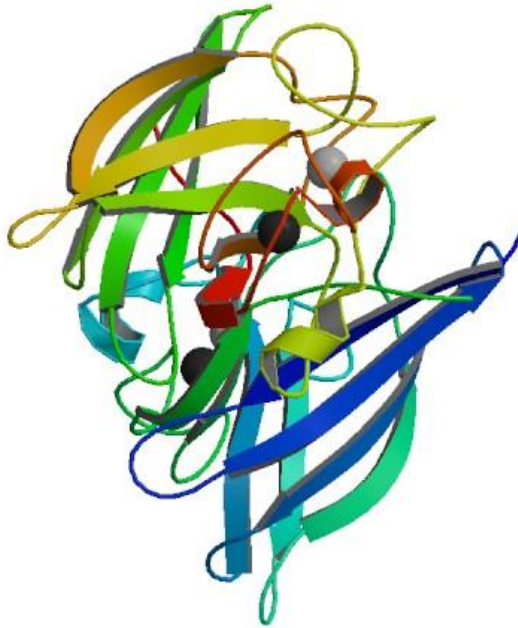


Figura 8. Estructura de la enzima superóxido dismutasa (SOD). Tomada de Protein Data Bank. http://www.rcsb.org/pdb/images/3pu7_bio_r_500.jpg. Entrada: 3pu7.

Catalasa (CAT, EC 1.11.1.6)

La CAT (Figura 9) es una homoproteína tetramérica que elimina el H_2O_2 sin necesitar el aporte del poder reductor, sin embargo, tiene una baja afinidad por el sustrato, lo que la hace poco eficiente en la eliminación de H_2O_2 cuando este se encuentra presente en concentraciones bajas. En las plantas la mayoría de la CAT se localiza en los peroxisomas, donde la concentración de H_2O_2 es muy alta (Feieraben, 2005). Esta enzima es una metaloproteína tetramérica, cuyo peso molecular se encuentra en el rango de 210-280 kDa. Consta de 4 subunidades idénticas que se mantienen unidas por interacciones no covalentes. Cada subunidad contiene un grupo prostético de protoporfirina IX y el contenido protohémico y el de hierro representan

un 1.1 % y 0.09 %, respectivamente, del peso molecular total de la enzima (Hadju *et al.*, 1977).

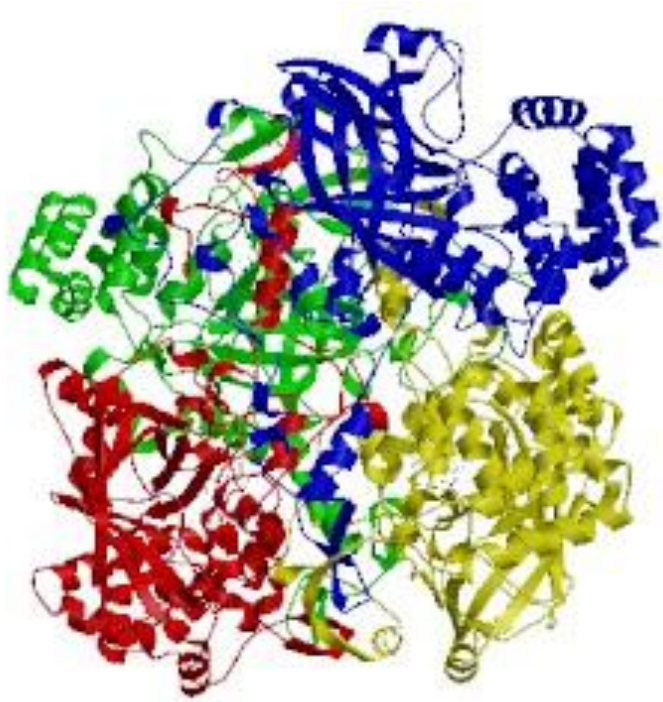
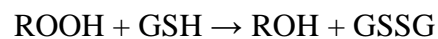


Figura 9. Estructura de la enzima catalasa (CAT). Tomada de Protein Data Bank. <http://www.cathdb.info/pdb/1a4e>. Entrada: 1a4e.

Glutation peroxidasa (GSH-Px, EC 1.11.1.9)

La enzima GSH-Px cataliza la reducción de hidroperóxidos orgánicos y peróxidos de lípidos, tales como los que se originan en las membranas en situación de estrés, utilizando GSH como donador de electrones (Hartikainen *et al.*, 2000).



Esta enzima comúnmente se encuentra en los cloroplastos de las células vegetales. Su función es eliminar el H_2O_2 y utiliza al GSH como donador de electrones.

En plantas esta enzima se puede clasificar en tres tipos: las seleno-dependientes, las cuales se componen de cuatro subunidades de 16 kDa y se han identificado en *Aloe vera* (Sabeih *et al.*, 1993), y las no seleno-dependientes fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa (PHGPXs) y la glutatión transferasa que muestra actividad de glutatión peroxidasa (GST-GPOX) (Eshdat *et al.*, 1997). Sin embargo, esto difiere de lo que indican otros autores, por lo que no existen pruebas suficientes para indicar que la enzima GSH-Px en plantas es seleno-dependiente.

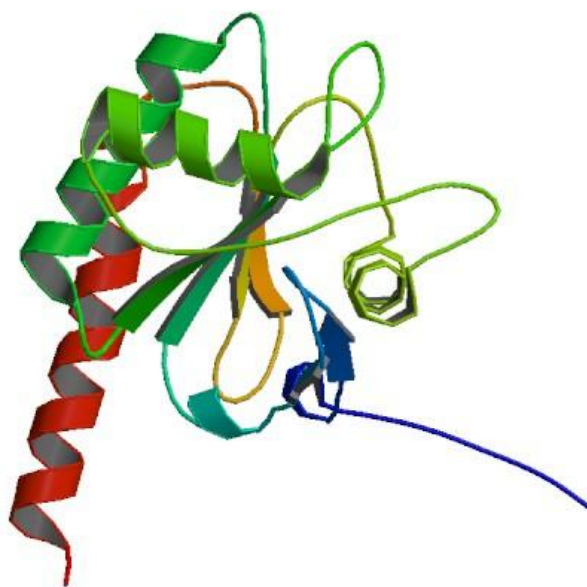


Figura 10. Estructura de la enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px). Tomada de Protein Data Bank.http://www.rcsb.org/pdb/images/3kij_bio_r_500.jpg?bioNum=1. Entrada: 3kij.

Ríos et al. (2008) indican que el selenio como selenato y selenito de sodio a diferentes dosis de aplicación en plantas de lechuga fueron eficientes para la detoxificación de H_2O_2 . Sin embargo, el selenato fue menos tóxico que el selenito.

Además, las plantas tratadas con selenato indujeron una mayor actividad de enzimas detoxificadoras como la ascorbato peroxidasa (APX) y glutathion peroxidasa (GSH-Px). De la misma forma, en zacate ryegrass el selenato fue más eficiente que el selenito como inductor de la enzima GSH-Px (Cartes *et al.*, 2005). La influencia positiva del Se sobre la actividad de la GSH-Px sugiere que, en plantas, esta enzima es seleno-dependiente (Hartikainen *et al.*, 2000).

Estudios realizados en plantas de trigo indican que el Se incrementó la actividad de enzimas como la catalasa (CAT) y peroxidasa (POD) a dosis bajas (0.05 mM Kg⁻¹), sin embargo, al incrementar la dosis (0.15 mM kg⁻¹) la actividad se redujo (Nowak *et al.*, 2004). A bajas concentraciones puede también activar a la enzima POD al mejorar el estrés oxidativo inducido por el aluminio, y participar en la dismutación espontánea del radical superóxido a H₂O₂ (Cartes *et al.*, 2010).

En plantas de colza y zacate ryegrass minimizó el efecto tóxico y el estrés oxidativo causado por los metales pesados (Filek *et al.*, 2008; Cartes *et al.*, 2010). Hawrylak *et al.* (2010) menciona que la adición de selenio en plantas de pepino, provocó el aumento en la producción de prolina y una disminución en la peroxidación de lípidos, lo que ayudo en la resistencia a estrés por frío. El Se incrementa la actividad de la SOD en las plantas de acerera (Kong *et al.*, 2005).

El Se reduce el estrés oxidativo del aluminio en plantas de centeno mediante la dismutación espontanea de los radicales superóxido y la activación de la enzima peroxidasa (Cartes *et al.*, 2010).

SELENIO EN LA CALIDAD NUTRICIONAL DE LOS CULTIVOS

La interacción de los nutrientes en relación al Se es muy importante, ya que determinan la calidad nutricional del cultivo. El Se y el fósforo (P) no pertenecen al mismo grupo en la tabla periódica, sin embargo, ambos son absorbidos por la planta en forma de aniones, por lo que ha sido muy estudiada dicha interacción. Carter *et al.* (1972) observaron que mediante la aplicación de P al suelo se logró aumentar la concentración de Se en un cultivo de alfalfa. Estudios más recientes como el de Liu *et al.* (2004) respaldan esta información al indicar que la adición de P incrementó el contenido de Se en plantas de arroz, lo que indica una beneficiosa interacción entre estos dos nutrientes. Al respecto, Hawrylak (2008) menciona que al adicionar Se en forma de selenito en plantas de maíz el contenido de P y calcio (Ca) aumentó, mientras que el contenido de potasio (K) disminuyó.

El efecto del Se al aplicar selenito a dosis bajas (5, 10 y 20 mg kg⁻¹) en plantas acumuladoras como el helecho chino (*Pteris vittata* L.) suprime la absorción de magnesio (Mg), K, hierro (Fe), cobre (Cu) y zinc (Zn), mientras que con altas dosis de selenito (40, 60, 80 y 100 mg kg⁻¹) incrementó el contenido de Ca, Mg y K. Lo anterior sugiere que el Ca, Mg y K pudieran estar involucrados en el mecanismo de tolerancia del Se. Sin embargo, el efecto del Se en el contenido nutrimental es variable según el cultivo de que se trate (Figura 11).



Figura 11. Efecto de la aplicación de Se en plantas de *Phaseolus vulgaris* L. cv. Strike (Hermosillo *et al.*, 2011).

INFLUENCIA DEL SELENIO SOBRE EL METABOLISMO

NITROGENADO DE LAS PLANTAS

El contenido de nitrógeno (N) en las plantas es determinante para el crecimiento, y el rendimiento, es totalmente dependiente de un suministro adecuado (Lawlor, 2002). El Se tiene una influencia sobre el contenido del nitrógeno en la planta según la forma química aplicada de este nutriente. Ríos *et al.* (2010) mencionan que la aplicación de 20 μM de Se en forma de selenato y 5 μM en forma de selenito incrementaron el contenido de N en plantas de lechuga, por lo que mejora el uso eficiente del N y por lo tanto beneficia el rendimiento, además aumentó la actividad de enzimas como NR, GS y GOGAT.

Ježek *et al.* (2011) mencionan que el metabolismo del Se está estrechamente ligado con el metabolismo nitrogenado de las plantas. Turakainen *et al.* (2006) menciona que en tubérculos de papa la mayoría del contenido de Se es componente de la fracción de proteínas presente (49-65%), dado que las proteínas son uno de los elementos resultantes del metabolismo nitrogenado en las plantas. Mientras que Cuderman *et al.* (2008) indica que en este mismo cultivo el 30% del Se presente es constituyente de proteínas.

El metabolismo nitrogenado está relacionado con el rendimiento en los cultivos. En este respecto, Turakainen *et al.* (2004) señala que el Se tiene un efecto positivo en el incremento del rendimiento. Además, otros estudios como el de Pennanen *et al.* (2002) mencionan que el Se incrementa el crecimiento en el cultivo de lechuga.

SELENIO EN LA NUTRICIÓN Y LA SALUD HUMANA

El consumo de Se en una cantidad adecuada es esencial para la salud humana ya que el Se es incorporado como un residuo selenocisteinil a las selenoproteínas que son necesarias para las funciones biológicas (Schomburg *et al.*, 2004; Lu y Holmgren, 2009). El adecuado funcionamiento de la hormona tiroidea depende de la disponibilidad de Se (Köhrle *et al.*, 2005). Este micronutriente es necesario también para el funcionamiento adecuado del sistema inmunológico por su reconocida función protectora contra infecciones virales (Manzanares, 2007). Además, es un componente de las enzimas glutatión peroxidasa, selenoproteína P y la tetraiodotironina 5' deiodinasa. Además, actúa como agente anticancerígeno bajo una adecuada ingesta (Rayman, 2000).

La deficiencia de Se se relaciona con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, anemia y con el incremento en la incidencia de cáncer (Thomson, 2004; Brenneisen *et al.*, 2005). Duffield *et al.* (2002) indican que un consumo de 200 $\mu\text{g día}^{-1}$ de Se reduce la incidencia de cáncer de pulmón y próstata. La recomendación del consumo diario es de 50-70 $\mu\text{g día}^{-1}$ (USDA, 2003); no obstante, un consumo mayor de 400 $\mu\text{g día}^{-1}$ tiene un efecto dañino en la salud (DRI, 2000). La ingesta media en general está en el rango de 20-300 $\mu\text{g día}$ (Patrick, 2004). La

biodisponibilidad del Se varía entre los diferentes alimentos, la SeMet (originada en plantas y animales) y SeCis (principalmente originada en animales) tienen alta biodisponibilidad (más del 90%), mientras que la biodisponibilidad del Se en formas inorgánicas como selenato y selenito es del 50% (Thomson, 2004) (Figura 13).

Las personas vegetarianas pueden tener baja ingesta de Se y están en riesgo de presentar deficiencias (Hardy y Hardy, 2004). El género es también un factor que influye debido al papel del Se en la expresión de las selenoproteínas (Hardy y Hardy, 2004; Galan *et al.*, 2005; Riese *et al.*, 2006). Algunos estudios han demostrado que el selenio tiene un efecto anticancerígeno mayor en hombres que en mujeres, sin embargo, aún no se han identificado los mecanismos específicos del género (Waters *et al.*, 2004; Wolters *et al.*, 2006; Hercberg *et al.*, 2007). Los compuestos orgánicos de Se como la MeSeCis, GGMeSeCis y SeMet son los que actúan como agentes quimioprotectores, en diferentes tipos como cáncer de mama, hígado y próstata (Ip y Ganther 1992; Vadgama *et al.*, 2000; Whanger, 2002; 2004). Por esta razón, se ha incrementado el interés en aumentar el contenido de Se en las plantas (Ellis *et al.*, 2004). Los selenocompuestos más comunes se presentan en la Figura 12 (Dumont *et al.*, 2006).

La diferencia entre la SeCis, que es la forma orgánica de Se más sintetizada en los tejidos humanos, y la SeMet, forma que es más predominante en plantas es muy importante, ya que al final de la degradación en el metabolismo de los humanos, el Se liberado de la SeMet está disponible para la síntesis de novo de la SeCis en las células (Figura 13) (Köhrle *et al.*, 2005; Ralston *et al.*, 2008).

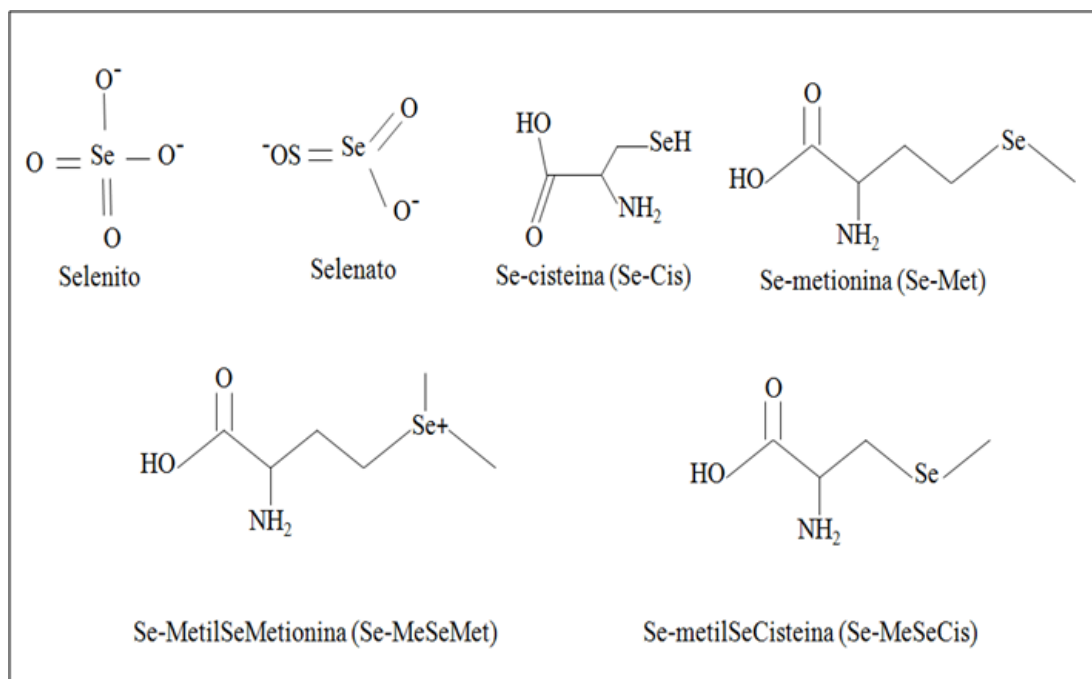


Figura 12. Selenocompuestos más comunes y su fórmula estructural.

La deficiencia de selenio se ha relacionado con el cáncer de mama y el riesgo de infecciones virales como el VIH/SIDA, influenza y hepatitis. Además, enfermedades cardiovasculares, trastornos reproductivos, y enfermedades neurológicas, como el Alzheimer y el Parkinson (Adams, 2008; Papp *et al.*, 2007).

Cada cultivo metaboliza diferentes compuestos orgánicos de Se, por ejemplo, *Allium* y *Brassica* acumulan SeMSeCis, que se pueden convertir en metil selenio (Ip *et al.*, 2002; Whanger, 2004). La SeMet es la forma dominante de selenio que se encuentra en los cereales (Fairweather-Tait *et al.*, 2010). Sin embargo, en algunos países se pueden encontrar alimentos elaborados con cultivos biofortificados con Se y suplementos con selenoaminoácidos (García *et al.*, 2011).

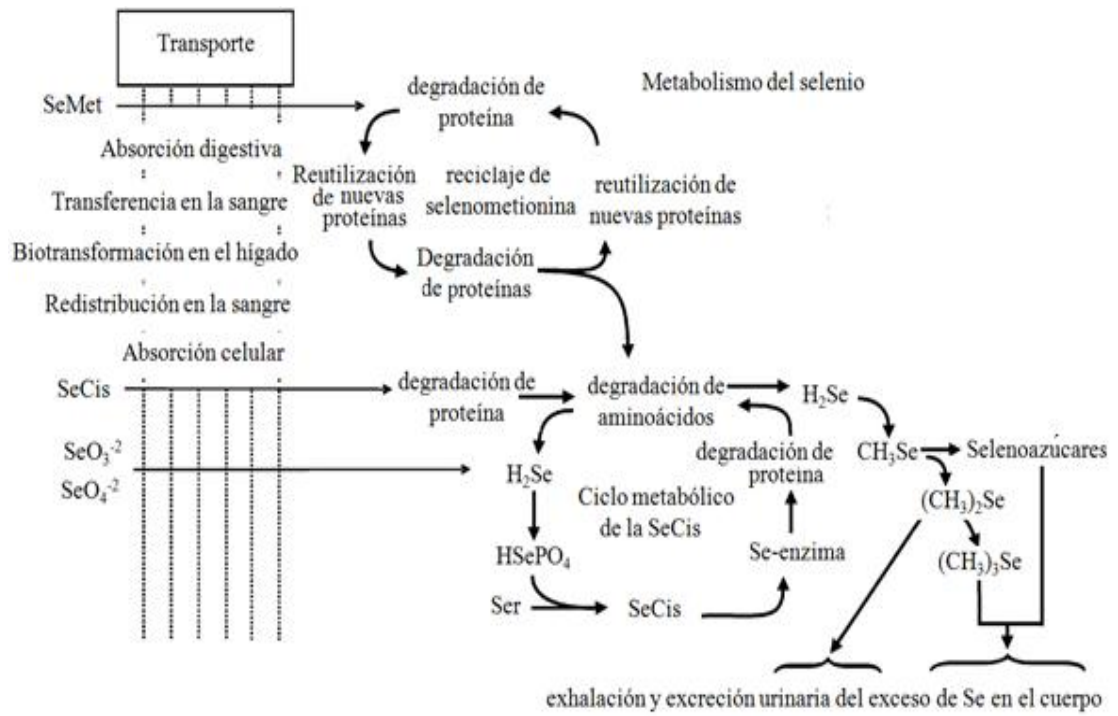


Figura 13. Ciclo metabólico de selenometionina, selenocisteína y selenio inorgánico (Ralston *et al.*, 2008).

HIPÓTESIS

El cultivo del frijol tiene las características ideales para un programa de biofortificación con selenio, y este mejorará la calidad nutricional e incrementará la capacidad antioxidante de sus frutos.

OBJETIVO GENERAL

Biofortificar con selenio (selenato y selenito) los frutos de frijol con el fin de evaluar su efecto en la capacidad antioxidante y calidad nutricional.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el efecto del selenio en la biomasa total del frijol, así como en la concentración de macro y micronutrientes en la semilla (calidad nutricional).
- Conocer la influencia del selenio sobre el metabolismo nitrogenado del cultivo del frijol.
- Conocer el patrón de distribución de selenio en la planta de frijol.
- Evaluar la biofortificación de selenio en frutos de frijol y la relación entre su concentración y la capacidad antioxidante por efecto de la aplicación de diferentes dosis de selenato y selenito.

LITERATURA CITADA

- Adams, E. J. (2008). A dynamic website for a government/industry-funded project exploring biofortification of wheat with selenium. *Bioscience Horizons*, 1: 75-84.
- Aggarwal, M., Sharma, S., Kaur, N., Pathania, D., Bhandhari, K., Kaushal, N., Kaur, R., Singh, K., Srivastava, A., Nayyar, H. (2011). Exogenous proline application reduces phytotoxic effects of selenium by minimising oxidative stress and improves growth in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Biological Trace Element Research*, 140: 354-367.
- Alscher, R. G., Erturk, N., Heath, L. S. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Biology*, 53: 1331-1341.
- Amarowicz, R., Troszynska, A., Barylko, P. N., Shahidi, F. (2004). Polyphenolics extracts from legume seeds: correlations between total antioxidant activity, total phenolics content, tannins content and astringency. *Journal of Food Lipids*, 11: 278-286.
- Arvy, M. P. (1989). Some factors influencing the uptake and distribution of selenite in the bean plant (*Phaseolus vulgaris*). *Plant and Soil*, 117: 129-133.
- Arvy, M. P. (1993). Selenate and selenite uptake and translocation in bean plants (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Experimental Botany*, 44: 1083-1087.
- Bañuelos, G. S., Lin, Z. Q. (2005). Phytoremediation management of selenium-laden drainage sediments in the San Luis Drain: a greenhouse feasibility study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62: 309-316.
- Bañuelos, G., Terry, N., Leduc, D.L., Pilon, E. A. H., Mackey, B. (2005). Field trial of transgenic Indian mustard plants shows enhanced phytoremediation of selenium-contaminated sediment. *Environmental Science & Technology*, 39: 1771-1777.
- Barraza, J. D., Flores, H. A. M., Galvan, H. D., Sánchez, Ch. E., Glossman, M. D. (2011). Computational characterization of sodium selenite using density functional theory. *Journal of Molecular Modeling*, 17: 701-708.
- Bell, P. F., Parker, D. R., Page, A. L. (1992). Contrasting selenatesulfate interactions in selenium-accumulating and nonaccumulating plant species. *Soil Science Society of America Journal*, 56: 1818-1824.
- Beninger, C. W., Hosfield, G. L. (2003). Antioxidant activity of extracts, condensed tannin fractions and pure flavonoids from *Phaseolus vulgaris* L. Seed coat color genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 7879-7883.

- Berken, A., Mullholland, M. M., LeDuc, D. L., Terry, N. (2002). Genetic engineering of plants to enhance selenium phytoremediation. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21: 567-582.
- Bouis, H. E. (2003). Micronutrient fortification of plants through plant breeding: can it improve nutrition in man at low cost?. *Proceeding of the Nutrition Society*, 62: 403-411.
- Brenneisen, P., Steinbrenner, H., Sies, H. (2005). Selenium, oxidative stress, and health aspects. *Molecular Aspects of Medicine*, 26: 256-67.
- Broadley, M. R., White, P. J., Bryson, R. J., Meacham, M. C., Bowen, H. C., Johnson, S. E., Hawkesford, M. J., McGrath, S. P., Zhao, F. J., Breward, N., Harriman, M., Tucker, M. (2006). Biofortification of UK food crops with selenium. *Proceeding of the Nutrition Society*, 65: 169-181.
- Cartes, P., Jara, A., Pinilla, L., Rosas, A., Mora, M. (2010). Selenium improves the antioxidant ability against aluminium-induced oxidative stress in ryegrass roots. *Annals of Applied Biology*, 156: 297-307.
- Cartes, P., Gianfera, L., Mora, M. L. (2005). Uptake of selenium and its antioxidants activity in ryegrass when applied a selenate and selenite form. *Plant and Soil*, 276: 359-367.
- Carter, D. L., Robbins, C. W., Brown, M. J. (1972). Effect of phosphorus fertilization on the selenium concentration in alfalfa (*Medicago sativa*). *Proceedings Soil Science Society of America*, 36: 624-628.
- Choung, M. G., Choi, B. R., An, Y. N., Chu, Y. H., Cho, Y. S. (2003). Anthocyanin profile of Korean cultivated kidney bean (*Phaseolus Vulgaris* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 7040-7043.
- Combs, G. F. J. (2001). Selenium in global food systems. *British Journal of Nutrition*, 85: 517-547.
- Corpas, F. J., Barroso, J. B., Del Rio, L. A. (2001). Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends in Plant Science*, 6: 145-150.
- Cuderman, P., Kreft, I., Germ, M., Kovačević, M., Stibilj V. (2008). Selenium species in selenium-enriched potatoes and drought exposed potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 9114-9120.
- De Souza, M. P., Pilon, S. E. A. H., Lytle, C. M., Hwang, S., Tai, J., Honma, T. S. U., Yeh, L., Terry, N. (1998). Rate-limiting steps in selenium assimilation and volatilization by Indian mustard. *Plant Physiology* 117: 1487-1494.

- Debolt, S., Melino, V., Ford, C. M. (2007). Ascorbate as a biosynthetic precursor in plants. *Annals of Botany*, 99: 3-8.
- Del Río, L. A., Sandalio, L. M., Corpas, F. J., Palma, J. M., Barroso, J. B. (2006). Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiology*, 141: 330-335.
- Del Rio, M., Font, R., Almela, C., Velez, D., Montoro, R., Bailon, A. D. (2002). Heavy metals and arsenic uptake by wild vegetation in the Guadiamar river area after the toxic spill of the Aznalcollar mine. *Journal of Biotechnology*, 98: 125-137.
- DRI, (2000). National Research Council, Washington: National Academy Press. pp. 284-319.
- Djanaguiraman, M., Devi, D. D., Shanker, A. K., Sheeba, A., Bangarusamy, U. (2005). Selenium an antioxidative protectant in soybean during senescence. *Plant and Soil*, 272: 77-86.
- Drever, J. I. (1997). The geochemistry of natural waters. 3rd. ed., Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, 193p.
- Duckart, E. C., Waldron, L. J., Donner, H. E. (1992). Selenium uptake and volatilization from plants growing in soil. *Soil Science*, 153: 94-99.
- Duffield, L. A. J., Reid, M. E., Turnbull, B. W., Combs, G.F., Slate, E. H., Fischbach, L. A., Marshall, J. R., Clark, L. C. (2002). Baseline characteristics and the effect of selenium supplementation on cancer incidence in a randomized clinical trial: a summary report of the Nutritional Prevention of Cancer Trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prevention*, 11: 630-639.
- Dumont, E., Vanhaecke, F., Cornelis, R. (2006). Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385: 1304-1323.
- Eapen, S., D'Souza, S. F. (2005). Prospects of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals. *Biotechnology Advances*, 23: 97-114.
- Ellis, D. R., Sors, T. G., Brunk, D. G., Albrecht, C., Orser, C., Lahner, B., Wood, K. V., Harris, H. H., Pickering, I. J., Salt, D. E. (2004). Production of S-methylselenocysteine in transgenic plants expressing selenocysteine methyltransferase. *Plant Biology*, 28: 4-1.
- Ellis, D. R., Salt, D. E. (2003). Plants, selenium and human health. *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 273-279.

- Eshdat, Y., Holland, D., Faltin, Z., Ben-Hayyim, G. (1997). Plant glutathione peroxidases. A timely review of a rapidly expanding field of interest in plant stress physiology. *Plant Physiology*, 100: 234-240.
- Eurola, M., Ekholm, P., Ylinen, M., Koivistoinen, P., Varo, P. (1989). Effects of selenium fertilization on the selenium content of selected Finnish fruits and vegetables. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 39: 345-350.
- Eurola, M. H., Ekholm, P. I., Ylinen, M. E., Koivistoinen, P. E., Varo, P. T. (1991). Selenium in Finnish food after beginning the use of selenate supplemented fertilizers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 56: 57-70.
- Eurola, M. H., Hietanie, V., Kontturi, M., Tuuri, H., Kangas, A., Niskanen, M., Saastamoinen, M. (2004). Selenium content of Finnish oats in 1997-1999: effect of cultivars and cultivation techniques. *Journal Agricultural and Food Science* 13: 46-53.
- Fairweather-Tait, S. J., Collings, R., Hurst, R. (2010). Selenium bioavailability: current knowledge and future research requirements. *American Journal Clinical Nutrition*, 91: 1484-1491.
- Fan, T. W. M., Teh, S. J., Hinton, D. E., Higashi, R. M. (2002). Selenium biotransformations into proteinaceous forms by foodweb organisms of selenium-laden drainage waters in California. *Aquatic Toxicology*, 57: 101-113.
- Feierabend, J. (2005). Catalases in plants: molecular and functional properties and role in stress defense, in: N. Smirnoff (Ed.), *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK 2005, pp. 101-140.
- Feist, L. J., Parker, D. R. (2001). Ecotypic variation in selenium accumulation among populations of *Stanleya pinnata*. *New Phytologist*, 149: 61-69.
- Filek, M., Keskinen, R., Hartikainen, H., Szarejko, I., Janiak, A., Miszalski, Z. (2008). The protective role of selenium in rape seedlings subjected to cadmium stress. *Journal of Plant Physiology*, 165: 833-844.
- Fordyce, F. (2005). Selenium deficiency and toxicity in the environment. In *Essentials of Medical Geology*, pp. 373–415 [O Selinus, B Alloway, J Centeno, R Finkelman, R Fuge, U Lindh and P Smedley, editors]. London: Elsevier.
- Foyer, C. H., Theodoulou, F. L., Delrot, S. (2001). The functions of inter and intracellular glutathione transport systems in plants. *Trends in Plant Science*, 6: 486-492.

- Foyer, C. H., Noctor, G. (2009). Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation and practical implications. *Antioxidants and Redox Signaling*, 11: 1-45.
- Foyer, C. H., Noctor, G. (2005). Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell and Environment*, 28: 1056-1071.
- Freeman, J. L., Zhang, L. H., Marcus, M. A., Fakra, S., McGrath, S. P., Pilon, S. E. A. H. (2006). Spatial 374 imaging, speciation and quantification of selenium in the hyperaccumulator plants *Astragalus 375 bisulcatus* and *Stanleya pinnata*. *Plant Physiology*, 142: 124-134.
- Galan, P., Briancon, S., Favier, A., Bertrais, S., Preziosi, P. (2005). Antioxidant status and risk of cancer in the SU.VI.MAX study: is the effect of supplementation dependent on baseline levels? *British Journal of Nutrition*, 94: 125-132.
- García, B. M. L., Hermosillo, C. M. A. Sánchez, C. E. (2011). The importance of selenium biofortification in food crops. *Current Nutrition & Food Science*, 7: 181-190.
- Gissel-Nielsen, G. (1998). Effects of selenium supplementation of field crops. In: Frankenberger WT, Engberg RA (eds), *Environmental Chemistry of Selenium*. Marcel Dekker, New York, pp. 99-112.
- Graham, R. D., Welch, R. M., Bouis, H. E. (2001). Addressing micronutrient malnutrition through enhancing the nutritional quality of staple foods: principles, perspectives and knowledge gaps. *Advances in Agronomy*, 70: 77-142.
- Gregorio, G.B., Senadhira, D., Htut, H., Graham, R.D. (2000). Breeding for trace mineral density in rice. *Food and Nutrition Bulletin*, 21: 382-386.
- Gupta, U. C., Gupta, S. C. (2002). Quality of animal and human life as affected by selenium management of soils and crops. *Communication in Soil Science and Plant Analysis*, 33: 15-18.
- Hadju, J., Wyss, S. R., Aebi, H. (1977). Properties of human erythrocyte catalases after crosslinking with bifunctional reagents: symmetry of the quaternary structure. *European Journal of Biochemistry*, 80: 199-207.
- Halliwell, B., Whiteman, M. (2004). Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology*, 142: 231-255.

- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford, U.K.: Oxford University Press.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*, Ed 4. Oxford University Press, UK. 704p.
- Hamilton, S. J. (2003). Review of residue-based selenium toxicity thresholds for freshwater fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56: 201-210.
- Hanson, B., Garifullina, G. F., Lindblom, S. D., Wangeline, A., Ackley, A., Kramer, A., Norton, A. P., Lawrence, C. B., y Pilon-Smits, E. A. H. (2003). Selenium accumulation protects Brassica juncea from invertebrate herbivory and fungal infection. *New Phytologist*, 159: 461-469.
- Hardy, G., Hardy, I. (2004). Selenium: the Se-XY nutraceutical. *Nutrition*, 20: 590-593.
- Hartikainen, H. (2005). Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 18: 309-318.
- Hartikainen, H., Xue, T., Piironen, V. (2000). Selenium as an antioxidant and pro-oxidant in ryegrass. *Plant and Soil*, 225: 193-200.
- Hasanuzzaman, M., Hossain, M. A., Fujita, M. (2010). Selenium in higher plants: physiological role, antioxidant metabolism and abiotic stress tolerance. *Journal of Plant Sciences*, 5: 354-375.
- Haslam, E. (1989). *Plant Polyphenols, Vegetable Tannins Revisited*. Cambridge University Press: Cambridge. 230p.
- Hawrylak, N. B. (2008). Effect of selenium on selected macronutrients in maize plants. *Journal of Elementology*, 13: 513-519.
- Hawrylak, N. B., Matraszek, R., Szymańska, M. (2010). Selenium modifies the effect of short-term chilling stress on cucumber plants. *Biological Trace Element Research*, 138: 307-315.
- Heijari, J., Kivimäenpää, M., Hartikainen, H., Julkunen-Tiitto, R., Wulff, A. (2006). Responses of strawberry (*Fragaria x ananassa*) to supplemental UV-B radiation and selenium under field conditions. *Plant and Soil*, 282: 27-39.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 572-584.
- Hercberg, S., Ezzedine, K., Guinot, C., Preziosi, P., Galan, P. (2007). Antioxidant supplementation increases the risk of skin cancer in women but not in men. *Journal of Nutrition*, 137: 2098-2105.

- Hermosillo, C. M. A., Sánchez, Ch. E., Guevara, A. A., Muñoz, M. E. (2011). Nitrogen metabolism, biomass and yield response of green bean plants to selenium fertilization. *Memorias de resúmenes del XIV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Hortícolas*, A. C., Primera edición. ISBN 978-607-8155-002. pag. 201.
- Hoewyk, D. V., Garifullina, G. F., Ackley, A. R., Abdel-Ghany, S. E., Marcus, M. A., Fakra, I. K., Inoue, E., Pilon, M., Takahashi, H., Pilon-Smits E. A. (2005). Overexpression of AtCpNifS enhances selenium tolerance and accumulation in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 139: 1518-1528.
- Hotz, C., McClafferty, B., Hawkes, C., Ruel, M., Babu, S. (2007). From harvest to health: challenges for developing biofortified staple foods and determining their impact on micronutrient status. *Food and Nutrition Bulletin*, 28: 271-279.
- Hu, Q., Xu, J., Pang, G. (2003). Effect of selenium on the yield and quality of green tea leaves harvested in early spring. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 3379-3381.
- Ip, C., Dong, Y., Ganther, H. E. (2002). New concepts in selenium chemoprevention. *Cancer and Metastasis Reviews*, 21: 281-289.
- Ip, C., Ganther, H. E. (1992). Comparison of selenium and sulfur analogs in cancer prevention. *Carcinogenesis*, 13: 1167-1170.
- Ježek, P., Hlušek, J., Lošák, T., Jůzl, M., Elzner, P., Kráčmar, S., Buňka, F., Martensson, A. (2011). Effect of foliar application of selenium on the content of selected amino acids in potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Soil and Environment*, 57: 315-320.
- Johns, T., Eyzaguirre P. (2007). Biofortification, biodiversity and diet: a search for complementary applications against poverty and malnutrition, *Food Policy*, 32: 1-24.
- Johnsson, L. (1991). Selenium uptake by plants as a function of soil type, organic matter content and pH. *Plant and Soil*, 133: 57-64.
- Keskinen, R., Ekholm, P., Yli-Halla, M., Hartikainen, H. (2009). Efficiency of different methods in extracting selenium from agricultural soils of Finland. *Geoderma*, 153: 87-93.
- Köhrle, J., Jakob, F., Contempéré, B., Dumont, J. E. (2005). Selenium, the thyroid and the endocrine system. *Endocrine Review*, 26: 944-84.
- Kong, L., Wang, M., Bi, D. (2005). Selenium modulates the activities of antioxidant enzymes, osmotic homeostasis and promotes the growth of sorrel seedlings under salt stress. *Plant Growth Regulation*, 45: 155-163.

- Lawlor, D. W. (2002). Carbon and nitrogen assimilation in relation to yield: mechanisms are the key to understanding production systems. *Journal of Experimental Botany*, 53: 773-787.
- Lee, M. J., Lee, G. P., Park, K. W. (2001). Effect of selenium on growth and quality in hidroponically-grown Korean Mint (*Agastache rugosa*). *Journal Korean Society for Horticultural Science*, 42: 483-486.
- Li, H. F., McGrath, S. P., Zhao, F. J. (2008). Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite. *New Phytologist*, 178: 92-102.
- Liu, Q., Wang, D. J., Jiang, X. J., Cao, Z. H. (2004). Effects of the interactions between selenium and phosphorus on the growth and selenium accumulation in rice (*Oryza Sativa*). *Environmental Geochemistry and Health*, 26: 325-330.
- Lu, J., Holmgren, A. (2009). Selenoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, 284: 723-727.
- Lu, J., X, Jiang, C., Kaeck, M., Ganther, H., Vadhanavikit, S., Ip. C. y Thompson, H. (1995). Dissociation of the genotoxic and growthinhibitory effects of selenium. *Biochemical Pharmacology*, 50: 213-219.
- Lyons, G., Stangoulis, J., Graham, R. (2003). High selenium wheat: biofortification for better health. *Nutrition Research Reviews*, 16: 45-60.
- Lyons, G. H., Stangoulis, J. C. R., Graham, R. D. (2004). Exploiting micronutrient interaction to optimize biofortification programs: the case for inclusion of selenium and iodine in the HarvestPlus program. *Nutrition Reviews*, 62: 247-252.
- Lyons, G. H., Ortiz, M. I., Stangoulis, J., Graham, R. (2005). Selenium concentration in wheat grain: is there sufficient genotypic variation to use in breeding? *Plant and Soil*, 269: 269-380.
- Mengel, K., Kirkby, E. A. (1987). Principles of Plant Nutrition. International Potash Institute, Bern, 687p.
- Millar, A. H., Mittova, V., Kiddle, G. (2003). Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses. *Plant Physiology*, 133: 443-447.
- Mittova, V., Guy, M., Tal, M., Volokita, M. (2004). Salinity up-regulates the antioxidative system in root mitochondria and peroxisomes of the wild salt tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. *Journal of Experimental Botany*, 55: 1105-1113.

- Manzanares, C. W., (2007). Revisión: Selenio en los pacientes críticos con respuesta inflamatoria sistémica. *Nutrición Hospitalaria*, 22: 295-306.
- Navrot, N., Rouhier, N., Gelhaye, E., Jacquot, J. P. (2007). Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Plant Physiology*, 129: 185-195.
- Nestel, P., Bouis, H. E., Meenakshi, J. V. (2006). Biofortification of staple food crops. *Journal of Nutrition*, 136: 1064-1067.
- Nowak, J., Kaklewski, K., Ligocki, M. (2004). Influence of selenium on oxidoreductive enzymes activity in soil and plants. *Soil Biology & Biochemistry*, 36: 1553-1558.
- Papp, L. V., Lu, J., Holmgren, A., Khanna, K. K. (2007). From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxidant & Redox Signal*, 9: 775-806.
- Patrick, L. (2004). Selenium Biochemistry and Cancer: A review of the literature. *Alternative Medicine Review*, 9: 239-258.
- Peng, X. L., Liu, Y. Y., Luo, S. G. (2002). Effects of selenium on lipid peroxidation and oxidizing ability of rice roots under ferrous stress. *Journal of Northeast Agricultural University*, 19: 9-15.
- Pennanen, A., Xue, T., Hartikainen, H. (2002). Protective role of selenium in plant subjected to severe UV irradiation stress. *Journal of Applied Botany*, 76: 66-76.
- Ralston, N.V.C., Ralston, C.R., Blackwell, J. L., Raymond, L. J. (2008). Dietary and tissue selenium in relation to methylmercury toxicity. *Neurotoxicology*, 29: 802-811.
- Ramírez-Bribiesca, J. E., Tórtora, J. L., Huerta, M., Aguirre, A., Hernández, L. M. (2001). Diagnosis of selenium status in grazing dairy goats on the Mexican plateau. *Small Ruminant Research*, 4: 81-85.
- Ramos, S. J., Faquin, V., Guilherme, L. R. G., Castro, E. M., Ávila, F. W., Carvalho, G. S., Bastos, C. E. A., Oliveira, C. (2010). Selenium biofortification and antioxidant activity in lettuce plants fed with selenate and selenite. *Plant, Soil and Environment*, 12: 584-588.
- Rayman, M. P. (2002). The argument for increasing selenium intake. *Proceedings of the Nutrition Society*, 61: 203-215.
- Rayman, M. P. (2000). The importance of selenium to human health. *The Lancet*, 356: 233-241.

- Rayman, M. P., Infante, H. G., Sargent, M. (2008). Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation. *British of Journal Nutrition*, 100: 238-253.
- Reilly, C. (2006). Selenium in Food and Health. Second edition. Springer Science+Business Media, LLC, New York, New York, 206p.
- Reilly, C. (1998). Selenium: A new entrant into the functional food arena. *Trends in Food Science and Technology*, 9: 114-118.
- Riese, C., Michaelis, M., Mentrup, B., Gotz, F., Kohrle, J. (2006). Selenium-dependent pre-and postranscriptional mechanisms are responsible for sexual dimorphic expression of selenoproteins in murine tissues. *Endocrinology*, 147: 5883-5892.
- Ríos, J. J., Rosales, M. A., Blasco, B., Cervilla, L. M., Romero, L., Ruiz, J. M. (2008). Biofortification of Se and induction of the antioxidant capacity in lettuce plants. *Scientia Horticulturae*, 116: 248-255.
- Ríos, J. J., Blasco, B., Rosales, M. A., Sánchez, R. E., Leyva, R., Cervilla, L. M., Romero, M. L., Ruiz, J. H. (2010). Response of nitrogen metabolism in lettuce plants subjected to different doses and forms of selenium. *Journal of the Science of Food and Agriculturae*, 90: 1914-1919.
- Robbins, R. J. (2003). Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51: 2886-2887.
- Romani, A., Vignolini, P., Galardi, C., Mulinacci, N., Benedettelli, S., Heimler, D. (2004). Germplasm characterization of Zolfino landraces (*Phaseolus vulgaris* L.) by flavonoid content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 3838-3842.
- Rui, H. L. (2004). Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action. *The American Society for Nutritional Sciences Journal Nutrition*, 134: 3479-3485.
- Ryter, S. W., Tyrrell, R. M. (1998). Singlet molecular oxygen ($^1\text{O}_2$): A possible effector of eukaryotic gene expression. *Free Radical Biology & Medicine*, 24: 1520-1534.
- Sabeh, F., Wright, T., Norton, S. J. (1993). Purification and characterization of a glutathione peroxidase from the *Aloe vera* plant. *Enzyme Protein*, 47: 92-98.
- Salinas, M. Y., Rojas, H. L., Sosa, M. E., Pérez, H. P. (2005). Anthocyanin composition in black bean varieties grown in Mexico. *Agrociencia*, 39: 385-394.

- Sands, D. C., Morris, C. E., Dratz, E. A., Pilgeram, A.L. (2009). Elevating optimal human nutrition to a central goal of plant breeding and production of plant-based foods. *Plant Science*, 177: 377-389.
- Schomburg, L., Schweizer, U., Kohrle, J. (2004). Selenium and selenoproteins in mammals: extraordinary, essential, enigmatic. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61: 1988-1995.
- Shao, H. B., Chu, L., Lu, Z. H., Kang, C. M. (2008). Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. *International Journal of Biological Science*, 4: 8-14.
- Shardendu, U., Salhani, N., Boulyga, S. F., Stengel, E. (2003). Phytoremediation of selenium by two helophyte species in subsurface flow constructed wetland. *Chemosphere*, 50: 967-973.
- Sies, H. (1991). Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin Wochenschr* 69: 965-968.
- Smrkolj P., Osvald M., Osvald J., Stibilj V. (2007). Selenium uptake and species distribution in selenium-enriched bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds obtained by two different cultivations. *European Food research & Technology*, 225: 233-237.
- Sors, T. G., Ellis, D. R., Salt, D. E. (2005). Selenium uptake, translocation, assimilation, and metabolic fate in plants. *Photosynth Research*, 86: 373-389.
- Spallholz, J., Hoffman, D. (2002). Selenium toxicity: cause and effects in aquatic birds. *Aquatic Toxicology*, 57: 27-37.
- Takahata, Y., Ohnishi, K. M., Furuta, S., Takahashi, M., Suda, I. (2001). Highly Polymerized Procyanidins in Brown Soybean Seed Coat with a High Radical-Scavenging Activity. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 49: 5843-5847.
- Terry, N., Zayed, A., De Souza, M., Tarun, A. (2005). Selenium in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1: 401-432.
- Terry, N., Zayed, A. M, De Souza, M. P., y Tarun, A. S. (2000). Selenium in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51: 401-432.
- Thomson, C. D. (2004). Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 58: 391-402.

- Troszynska, A., Estrella, I., López, A. M. L., Hernández, T. (2002). Antioxidant activity of pea (*Pisum sativum L.*) seed coat acetone extract. *Lebensmittel-Wissenschaft und Tech.* 35: 158-164.
- Turakainen, M. (2007). Selenium and its effects on growth, yield and tuber quality in potato. University of Helsinki, Helsinki. ISBN: 9521034661, 50p.
- Turakainen, M., Hartikainen, H., Ekholm P., Seppänen, M. M. (2006). Distribution of selenium in different biochemical fractions and raw darkening degree of potato (*Solanum tuberosum*) tubers supplemented with selenate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 8617-8622.
- Turakainen, M., Hartikainen, H., Seppänen, M. M. (2004). Effects of selenium treatments on potato (*Solanum tuberosum L.*) growth and concentrations of soluble sugars and starch. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 5378-5382.
- USDA (2003) Dietary reference intakes: Elements. <http://www.nap.edu>. 15 Junio 2010.
- Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B. D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 4113-4117.
- Vinson, J.A., Yousef, A., Mamdouh, M., Jinhee, J. (1995). Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for heart disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 2800-2802.
- Wang, Z., Gao, Y. (2001). Biogeochemical cycling of selenium in Chinese environments. *Applied Geochemistry*, 16: 1345-1351.
- Waters, D. J., Chiang, E. C., Cooley, D. M., Morris, J. S. (2004). Making sense of sex and supplements: differences in the anticarcinogenic effects of selenium in men and women. *Mutation Research*, 551: 91-107.
- Welch, R. (2002). Breeding strategies for biofortified staple plant foods to reduce micronutrient malnutrition globally, symposium plant breeding: A new tool for fighting micronutrient malnutrition. *Journal of Nutrition*, 132: 495-499.
- Welch, R., Graham, R. (1999). A new paradigm for world agriculture: Meeting human needs, Productive, sustainable, nutritious. *Field Crops Research*, 60: 1-10.
- Welch, R., Graham, R. (2004). Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. *Journal of Experimental Botany*, 55: 353-364

- Whanger, P. D. (2004). Selenium and its relationship to cancer: an update. *British Journal of Nutrition*, 91: 11-28.
- White, P. J., H.C. Bowen, P. Parmaguru, M. Fritz, W.P. Spracklen Spiby, R. E. (2004). Interactions between selenium and sulphur nutrition in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 55:1927-1937.
- White, P. J., Broadley, M. R., Bowen, H. C., Johnson, S. E. (2007). Selenium and its relationship with sulfur. In: Hawkesford MJ, de Kok LJ eds. Sulfur in plants – an ecological perspective. *Dordrecht: Springer*, 225-252.
- White, P. J., Broadley, M. R. (2005). Biofortifying crops with essential mineral elements. *Trends Plant Science*, 10:586-593.
- White, P. J., Bowen, H. C., Parmaguru, P., Fritz, M., Spracklen, W. P., Spiby, R. E. (2004). Interactions between selenium and sulphur nutrition in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 55: 1927-1937.
- Who (2002). The World Health Report. Reducing risks, promoting healthy life. Geneva, Switzerland: *World Health Organization*, 2002: 1-230.
- Who, (2006). Guidelines on Food Fortification with Micronutrients, World Health Organization/Food and Agricultural Organization of the United Nations, WHO/FAO, Geneva, 2006. 527p.
- Wolters, M., Hermann, S., Golf, S., Katz, N., y Hahn, A. (2006). Selenium and antioxidant vitamin status of elderly German women. *European Journal of Clinical Nutrition*, 60: 85-91.
- Wyatt, C. J., Melendez, J. M., Acuna, N., Rascon, A. (1996). Selenium in foods in Northern Mexico, their contribution to the daily Se intake and the relationship of Se plasma levels and glutathione peroxidase activity. *Nutrition Research* 16: 949-960.
- Ximenez, E. P., Alonso, I., Madrid, A. Y., Camára, C. (2004). Establishment of selenium uptake and species distribution in lupine, Indian mustard and sunflower plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 832-838.
- Xu, J., Hu, Q. (2004). Effect of foliar application of selenium on the antioxidant activity of aqueous and ethanolic extracts of selenium enriches rice. *Journal and Agricultural Food Chemistry*, 52: 1759-1763.
- Xu, J., Zhu, S., Yang, F., Cheng, L., Hu, Y., Pan, G., Hu, Q. (2003). The influence of selenium on the antioxidant activity of green tea. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83: 451-455.

- Yu, X. Z., Gu, J. D. (2008). Differences in uptake and translocation of selenate and selenite by the weeping willow and hybrid willow. *Environmental Science and Pollution Research*, 15: 499-508
- Zayed, A. M., Lytle, C. M., Terry, N. (1998). Accumulation and volatilization of difference chemical species of selenium by plants. *Planta*, 206: 284-292
- Zhao, C. Y, Ren, J. H., Xue, C. Z. (1993). Selenium in soils of selenium-rich areas in Ziyang County. *Acta Pedologica Sinica*, 30: 253-259.

RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN

CAPITULO I

Ionome variation in bean plant growth under different Se forms and application rates

Martha A. Hermosillo-Cereceres¹; Esteban Sánchez-Chávez^{1*}; René R. Balandran-Quintana²; Ana M. Mendoza-Wilson²; Alexandro Guevara-Aguilar¹; Ezequiel Muñoz-Márquez¹; Monica L. García-Bañuelos¹

* esteban@ciad.mx (corresponding author), mhermosillo@estudiantes.ciad.mx, rbalandran@ciad.mx, mwilson@ciad.mx, aguevara@ciad.mx, emunoz@ciad.mx, garciabm@ciad.mx

¹*Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Coordinación Delicias. Av. 4^a Sur 3820. Fraccionamiento Vencedores del Desierto. Cd. Delicias, Chihuahua, C. P. 33089. México.*

²*Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal Hermosillo. Km. 0.6 Carretera a la Victoria. Cd. Hermosillo, Sonora, México. C.P. 83000. Tel. (662) 280 01 46.*

Artículo publicado en: *Journal of Food, Agriculture & Environment Vol.9 (3&4): 374-378. 2011*



Ionome variation in bean plant growth under different Se forms and application rates

Martha A. Hermosillo-Cereceres ¹, Esteban Sánchez-Chávez ^{1*}, René R. Balandran-Quintana ²,
Ana M. Mendoza-Wilson ², Alexandro Guevara-Aguilar ¹, Ezequiel Muñoz-Márquez ¹ and Monica L. García-Bañuelos ¹

¹ Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Coordinación Delicias, Av. 4ª Sur 3820, Fraccionamiento Vencedores del Desierto, Cd. Delicias, Chihuahua, C. P. 33089, México. ² Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal, Km. 0.6 Carretera a la Victoria, Cd. Hermosillo, Sonora, C. P. 83304, México. e-mails: esteban@ciad.mx, mhermosillo@estudiantes.ciad.mx, rbalandran@ciad.mx, mwilson@ciad.mx, aguevara@ciad.mx, emunoz@ciad.mx, garciabm@ciad.mx

Received 18 July 2011, accepted 20 September 2011.

Abstract

The study of the ionome in crops enables us to determine plant's nutritional quality and the possible causes of its variations. Therefore, in this study, 6 rates of sodium selenite and sodium selenate (0, 10, 20, 40, 80 and 160 μ M) were applied for 40 days to bean plants in order to ascertain how selenium biofortification influenced the ionome of the crop. The biofortification of agricultural crops with micronutrients is the process of increasing the bioavailable concentrations of essential elements in the edible parts of cropped plants. The total biomass of the plant, the selenium concentration of the seed, the fruit yield, and the micro/macronutrient concentrations were determined in the leaf. The results indicated that selenate was less toxic than selenite, as high rates of this element drastically diminished plant biomass. In general, the essential nutrients proved antagonistic towards selenium in its forms and rates applied to the bean crop given that the two forms of selenium lowered the concentration of these nutrients in the leaf. Nevertheless, none of these nutrients fell below the sufficiency range for this crop. Selenium favored only higher calcium concentrations without reaching toxic values for the plant, and therefore we can state that fertilization with selenium improves bean yield. Finally, it is important to note that the increase of the selenium content in bean under biofortification programs constitutes a promising strategy in cropping systems that could increase the ingestion of this nutrient in the general population, fostering benefits that this element offers in human health.

Key words: Ionome, variation, selenium, *Phaseolus vulgaris* L., biofortification, application, rates, selenite, selenate.

Introduction

Plant mineral composition and its changes in response to physiological stimuli, state of development, and genetic modifications is defined as the ionome ¹. Thus, the ionome indicates the nutritional quality of the plant and the possible causes of any variation. Selenium (Se) is a trace element that has gained importance in recent years for its benefits both in plants as well as in humans, so that today it is studied for use in biofortification programs in crops in order to benefit human health ^{2, 3}. Different studies indicate that Se, at appropriate application rates, can be advantageous for some aspects of a crop, e.g. improving its antioxidant functions, while high rates in plants that accumulate Se bolster defenses against insect pests ^{4, 5}. However, whether this element is essential for plants is still under debate, but its importance in plant metabolism has been associated with counteracting senescence ⁶. For some species, such as the fern *Pteris vittata* L., a high rate of Se applied as selenite in the culture medium suppresses the uptake of some nutrients, such as magnesium (Mg), potassium (K), phosphorus (P), iron (Fe), copper (Cu), and zinc (Zn) ⁷. However, studies on corn (*Zea mays* L.) have reported that Se favors the accumulation of P and Ca but reduces K accumulation ⁸.

Se uptake increases with the Ca²⁺ concentrations, while SO₄²⁻ inhibits Se uptake even more than it is favored by Ca²⁺ ⁹. Ríos et

al. ¹⁰ mention that Se promotes N uptake in lettuce plants because this element stimulates the activity of enzymes participating in its reduction and improves the N level in the plant.

The Se content in plant foods depends directly on the level of this element in the soil, and Se accumulation in an organism is determined by the total content of Se or the chemical form retained by that organism ¹¹. Uptake of this element by plants is affected by several factors, such as the Se concentration in the soil, soil moisture, pH, salinity, sulfate concentration, plant species, soil management practices and competition of other anions for binding sites ^{12, 13}. Plants can take up Se in inorganic forms, such as selenate and selenite, or organic forms, such as selenocystine or selenomethionine ¹⁴. The organic forms of selenium provide the most benefits for human health ¹⁵. The chemical form of Se determines its bioavailability, metabolic pathway and function in biofortification of a crop ¹⁶. Sodium selenite or selenate are the inorganic Se forms most commonly used in the research of agricultural crops. Increasing the Se concentrations through the application of Se fertilizers can be complemented by breeding crops with an increased ability to acquire and accumulate selenium ¹⁴. However, little information is available on the effect of Se in the ionome of cultivated plants, whereas for some crops it is suitable to increase the concentration of some nutrients ¹⁷, for

others a strong antagonism may result¹⁸. Therefore, the aim of the present work was to ascertain the influence of Se in the ionome of bean plants biofortified with sodium selenite and selenate.

Materials and Methods

Crop design and plant sampling: Seeds of bean (*Phaseolus vulgaris* L., cv. Strike) were germinated and grown in a substrate mix (peat moss, vermiculite and perlite at a ratio 3:1:1) in an experimental greenhouse in Delicias, Chihuahua, Mexico, at a mean temperature of 25±4°C inside the greenhouse. Throughout the growing cycle the bean plants received a nutrient solution with 6 mM NH₄NO₃, 1.6 mM K₂HPO₄, 2.4 mM K₂SO₄, 4.0 mM CaCl₂·2H₂O, 1.4 mM MgSO₄, 5 μM Fe-EDDHA, 2 μM MnSO₄·H₂O, 1.0 μM ZnSO₄·7H₂O, 0.25 μM CuSO₄·5H₂O, 0.3 μM (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O and 0.5 μM H₃BO₃ (pH 5.5-6.0)¹⁹.

The different Se treatments (Na₂SeO₃ and Na₂SeO₄) at doses of 0, 10, 20, 40, 80 and 160 μM were applied with the nutrient solution for 40 days, beginning 20 days after sowing. A completely randomized experimental design was used, respectively, with 6 treatments of selenite and selenate and 4 replicates per treatment.

The plants were sampled at 60 days after sowing, at full pod development. All the leaf samples were taken in the mature state. The material was rinsed three times in distilled water after disinfection with a non-ionic detergent at 1% and blotted onto filter paper¹². Then, samples were lyophilized to determine the dry mass and selenium, and mineral nutrient concentrations. Biomass dry weight was recorded and expressed as mg DW.

Yield was expressed as the mean seed weight per plant. Collected beans were weighed on each plant at sampling. Commercial yield (kg per plant) represents beans with acceptable color and caliber.

Determination of selenium: For the determination of the Se concentration, 25 mg of sample were digested with 2.5 ml of concentrated HNO₃ and 1 ml of H₂O₂ in an analytical microwave oven. According to Pedrero *et al.*²⁰, the resulting solution was diluted to 25 ml with deionized water and the metal concentration determined by ICP-MS. The Se concentration was expressed in mg kg⁻¹ of dry weight.

Determination of mineral nutrients: Following Wolf²¹, the N, P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu and Ni were mineralized by wet digestion. For this, 0.2 g of dry leaves were ground and mineralized with 12 N H₂SO₄ and 30% H₂O₂, free P at a temperature of 275°C to 300°C. From the resulting mineralization, and after the addition of 20 mL of deionized H₂O, the mineral nutrients were determined as described above.

The total N concentration was determined by colorimetry based on the Berthelot reaction with slight modifications²². The total P concentration was determined using the colorimetric nitrovanadomolybdate method²³, while the total K concentration was analyzed by flame photometry²⁴. The total Mg and Ca concentrations were quantified by atomic absorption spectrophotometry as well as the micronutrients Fe, Mn, Zn and Ni²⁵.

Statistical methods: A minimum of four replicates was analyzed. Data were analyzed using the ANOVA²⁶. When F tests were significant, differences between treatment means were compared using LSD at the 0.05 probability level. Levels of significance

were represented by $P < 0.01$. Results were shown mean values ± SE.

Results and Discussion

Selenium (Se) is a micronutrient essential for human, animals, and some microorganisms. Although all plants are able to take up and metabolize selenium, the assumption about its necessity for higher plants has yet not been fully confirmed⁷. This element has a strong impact on the biomass of plants, depending on the inorganic form applied (selenate or selenite)^{4,27}. In our study, the total biomass declined 45.7% at the highest application rate of selenite (160 μmol) with respect to control (Fig. 1a). This was attributed to a toxic effect of Se, which could appear because some plants, such as beans, that do not hyperaccumulate Se do not have a detoxifying system for Se, and when the plant is subjected to high dosages, the element cannot be methylated and volatilized to eliminate it²⁸.

The results presented here indicate that the selenate form is less toxic than the selenite, because the high levels of selenate increased shoot biomass. This finding is consistent with the results of Ríos *et al.*⁴, who found that high doses of selenate induced greater biomass accumulation in lettuce than the high doses of selenite did. The toxic effect of Se at high application rates in plants is presumably due to its pro-oxidant role, favoring the production of lipidic-peroxide radicals (LOO·)²⁹, causing DNA breakdown and non-selective oxidation of organic molecules³⁰.

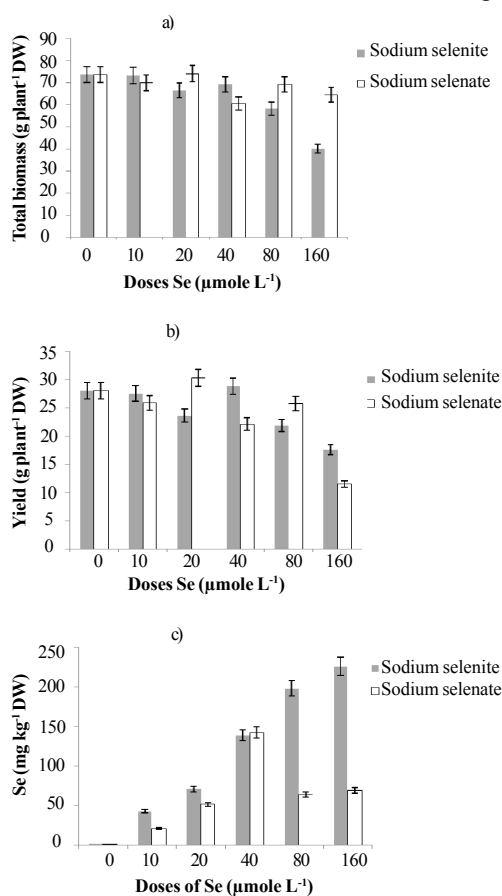


Figure 1. Total biomass, seed yield and concentration of Se in seeds of bean plant cv. Strike in response to different application rates of selenate and selenite. All data points for selenite and selenate are significantly different from initial values at $P < 0.01$ based on LSD at the 0.05 probability level.

With respect to seed yield (Fig. 1b), the application rates that most boosted yield were 40 μM of selenite and 20 μmol of selenate, with an increase of 2.8% and 8.0%, respectively, in relation to control. These results differ from those of Lee *et al.* ³⁴, in which table vegetables (lettuce, broccoli, and parsley) receiving 20 mg L^{-1} of sodium showed diminished productivity.

The translocation of Se from the root to the shoot of a plant depends on the chemical form of Se supplied, with selenate being transported in a much easier way than selenite ³¹. Our results revealed significant differences in Se accumulation in the seed (Fig. 1c), as selenite promoted the accumulation of Se in comparison with selenate, perhaps because moderate salinity levels, by the effect of sulfate application, can inhibit selenate uptake enough to reverse Se availability ^{2, 32}. The higher concentration of Se in the fruit by the effect of the selenite application could be an advantage for the greater Se accumulation in the organic form in the crop, as selenite is more rapidly assimilated to organic forms than the selenate is ³³.

The growth and good development of plants depend on the equilibrium in essential elements under adequate supply, and therefore it is necessary to study the ionome of the crop ¹. In the present study, the highest N concentration was found in plants treated with 20 μM selenite and 80 μM selenate (Fig. 2), this coinciding with the maximum foliar biomass at low application

rates of selenite and high rates of selenate. The total N, the result of the sum of the total reduced N and the NO_3^- , is considered to be a critical parameter to determine the nutritional state of plants and productivity ³⁵.

With respect to the P concentration, our results show a decline with both Se forms applied (Fig. 2), this being more pronounced with selenate. These results run counter to trends found in corn, in which selenite augmented P accumulation ¹⁸. On the other hand, Khattab observed that selenate diminished P accumulation in rocket *Eruca sativa* ³⁶.

In our work, the K concentrations did not significantly differ with the Se forms or application rates applied (Fig.2). This coincides with Sagen and Hoesh ³⁷, who have indicated that selenate application did not alter the concentration of essential nutrients in cereals. Meanwhile, Lee *et al.* ³⁴ reported a negative correlation between the selenate applied and K in different vegetables (broccoli, lettuce, celery and parsley).

On the other hand, the magnesium (Mg) concentration remained unaffected by the application rate of Se in the form of selenate, the greatest decrease being registered at 160 μmol (Fig. 2). These results contrast with those of Ríos *et al.* ¹⁰, who noted that high application rates of selenite (120 μmol) and low rates of selenate (60 μmol) lowered the Mg concentration in lettuce plants.

In relation to the Ca concentration, we found significant

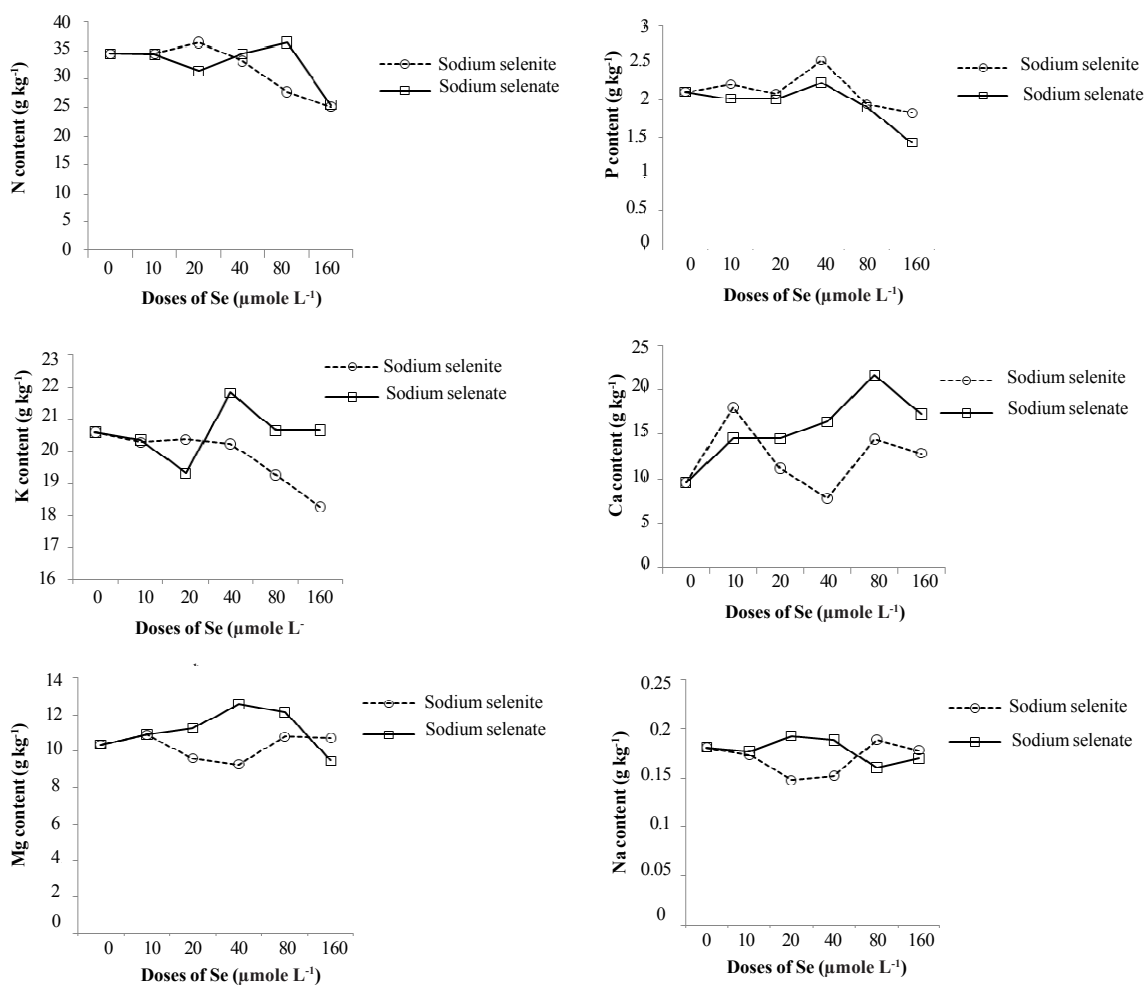


Figure 2. N, P, Ca, Mg and Na contents in the leaves of beans grown in nutrient solution with different doses of selenite and selenate of sodium. All data points for selenite and selenate are significantly different from initial values at $P < 0.01$ based on LSD at the 0.05 probability level.

differences (Fig. 2). The accumulation of this element rose with the rate of selenite and selenate applied, as opposed to the findings of Lee *et al.*³⁴, studying table vegetables (broccoli, lettuce, celery and parsley), in which the sodium selenate application lowered the Ca concentration. In our study, the concentrations of sodium did not significantly differ on applying the different Se forms and rates.

Trace elements are also important for the proper development of the plant and are normally required in small quantities³⁸. In our study, we found significant differences in zinc (Zn), manganese (Mn), iron (Fe) and copper (Cu), given that the increased rate of Se inhibited the uptake of these nutrients (Fig. 3), particularly at a rate of 160 μmol , apparently indicating an antagonism of Se with these elements, as proposed by Fargašová *et al.*³⁹, who reported that the uptake of elements such as Zn and Cu is blocked by Se in mustard plants.

Studies with Ni in lettuce plants showed synergism between this element and selenium, since Se as sodium selenite promoted greater uptake of Ni in these plants, this contention coinciding with our findings, as only the selenite form at the highest application rate (160 μmol) raised the Ni concentration in bean plants (Fig. 3)⁸.

The capacity of the plants to accumulate Se differs according to the crop, application rate and chemical form applied⁴⁰. In our study, we found significant differences in the Se concentration in the leaves (Fig. 3), presenting the highest levels at 160 μmol of selenite and 40 μmol of selenate, although, as mentioned above, the high concentrations of selenite caused plant toxicity in bean, reducing the biomass, whereas the application of high rates of selenate did not drastically reduce biomass, but resulted in lower seed yield, and thus the most appropriate application rate to raise the Se concentrations without affecting yield would be 40 μmol of selenite and 20 μmol of selenate in bean.

Conclusions

Our results show an antagonism of essential micronutrients with Se in its two forms and different application rates in the bean crop, given that both selenite as well as selenate lowered the concentration of these nutrients in the bean leaf, although none of these nutrients fell below the range of sufficiency for this crop. With respect to the essential macronutrients, selenium favored only the increase in Ca concentrations, without reaching values that would be toxic for the plant. Consequently, we can state that fertilization with Se for the bean crop is suitable without causing

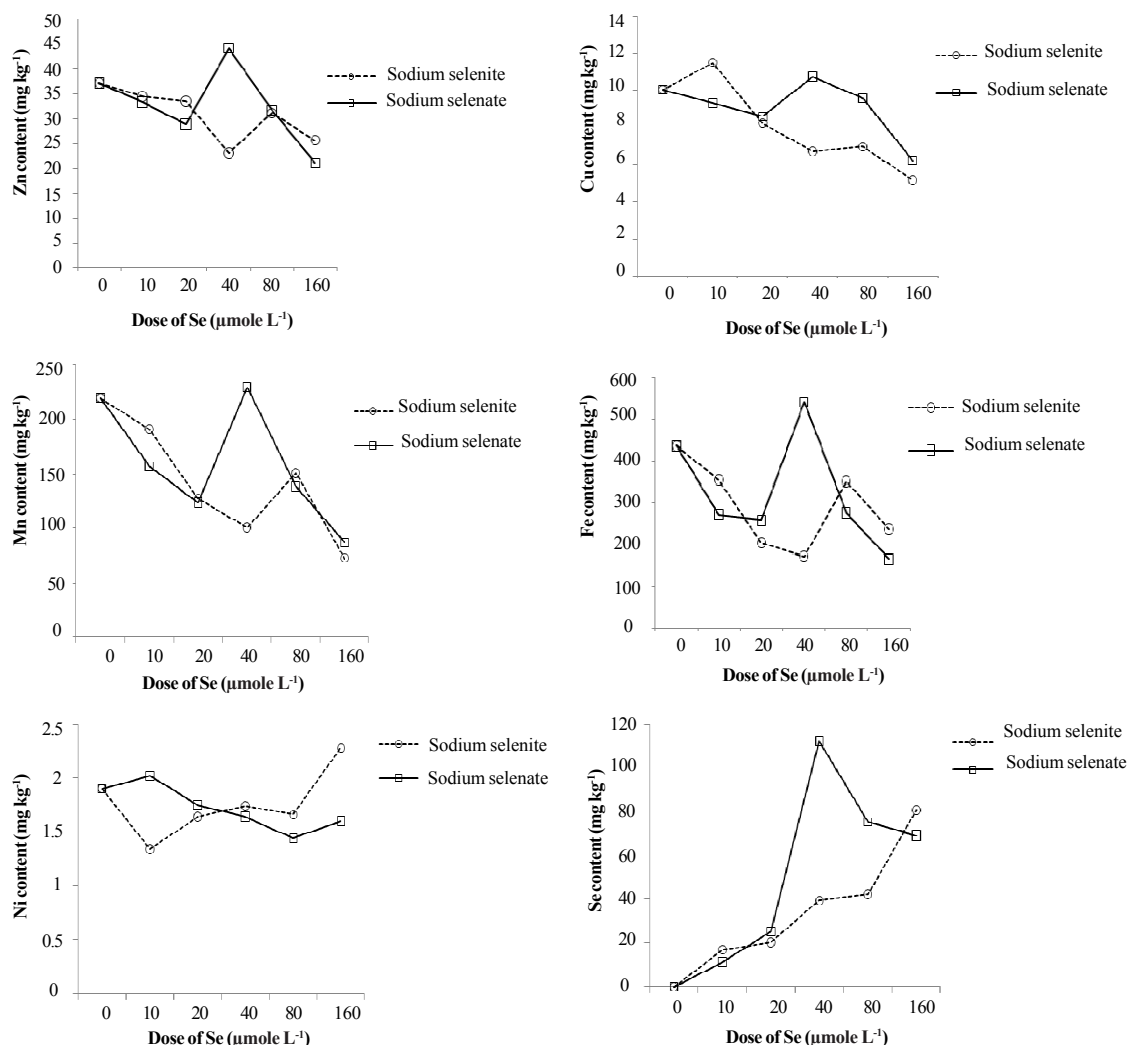


Figure 3. Zn, Cu, Mn, Fe, Ni and Se contents in the leaves of beans grown in nutrient solution with different doses of selenite and selenate of sodium. All data points for selenite and selenate are significantly different from initial values at $P < 0.01$ based on LSD at the 0.05 probability level.

damage to the yield under the appropriate doses. Finally, to raise the Se concentration in bean under biofortification programs is a promising strategy in cropping systems in order to increase the ingestion of selenium in the general population and provide the benefits that this element offers in human health.

Acknowledgements

This work was financed by the project of Ciencia Básica de CONACYT, No. 081055. Also, we thank CONACYT for the grant awarded to Martha Aracely Hermosillo Cereceres for doctoral studies in the postgraduate programme CIAD.

References

- ¹Salt, D. E., Baxter, I. and Lahner, B. 2008. Ionomics and the study of the plant ionome. *Plant Biol.* **59**:709-733.
- ²Terry, N., Zayed, A. M., De Souza, M. P. and Tarun, A. S. 2000. Selenium in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**: 401-32.
- ³Broadley, M. R., White, P. J., Bryson, R. J., Meacham, M. C., Bowen, H. C., Johnson, S. E., Hawkesford, M. J., McGrath, J. P., Fang-Jie, Z., Breward, N., Harriman, M. and Tucker, M. 2006. Biofortification of UK food crops with selenium. *P. Nutr. Soc.* **65**:169-181.
- ⁴Ríos, J. J., Rosales, M. A., Blasco, B., Cervilla, L. M., Romero, L. and Ruiz, J. M. 2008. Biofortification of Se and induction of the antioxidant capacity in lettuce plants. *Sci Hort.* **116**:248-255.
- ⁵Freeman, J. L., Lindblom, S. D., Quinn, C. F., Fakra, S., Marcus, M. A. and Pilon-Smits E. A. H. 2007. Selenium accumulation protects plants from herbivory by orthoptera due to toxicity and deterrence. *New Phytol.* **175**:490-500.
- ⁶Germ, M. and Stibilj, V. 2007. Selenium and plants. *Acta Agric. Slov.* **89**:65-71.
- ⁷Feng, R., Wei, C., Tu, Z. and Wu, F. 2009. Effects of Se on the uptake of essential elements in *Pteris vittata* L. *Plant Soil* **325**:123-132.
- ⁸Hawrylak, B., Matraszek, R. and Szymanska, M. 2007. Response of lettuce (*Lactuca sativa* L.) to selenium in nutrient solution contaminated with nickel. *Veg. Crop Res.* **67**:63-70.
- ⁹Hyun, S., Burns, P. E., Murarka, I. and Lee, L. S. 2006. Selenium (IV) and (VI) sorption by soils surrounding fly ash management facilities. *Vadose Zone J.* **5**:1110-1118.
- ¹⁰Ríos, J. J., Blasco, B., Rosales, M. A., Sanchez-Rodriguez, E., Leyva, R., Cervilla, L. M., Romero, L. and Ruiz, J. M. 2010. Response of nitrogen metabolism in lettuce plants subjected to different doses and forms of selenium. *J. Sci. Food Agric.* **90**:1914-1919.
- ¹¹Lin, Z. Q. 2005. Bioaccumulation. In Lehr, J. H. and Keeley, J. (eds). *Water Encyclopedia: Surface and Agricultural Water*. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ, pp. 34-36.
- ¹²Wu, L. 2004. Review of 15 years of research on ecotoxicology and remediation of land contaminated by agricultural drainage sediment rich in selenium. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **57**:257-269.
- ¹³Eich-Greatorex, S., Krogstad, T. and Sogn, T. A. 2010. Effect of phosphorus status of the soil on selenium availability. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* **173**:337-344.
- ¹⁴White, P. J., Broadley, M. R., Bowen, H. C. and Johnson, S. E. 2007. Selenium and its relationship with sulfur. In Hawkesford, M. J. and Kok, L. J. (eds). *Sulfur in Plants – An Ecological Perspective*. Springer, London, UK, pp. 225-252.
- ¹⁵Manzanares-Castro, W. 2007. Revisión selenio en los pacientes críticos con respuesta inflamatoria sistémica. *Nutr. Hosp.* **22**:295-306.
- ¹⁶Whanger, P. D. 2002. Review selenocompounds in plants and animals and their biological significance. *J. Am. Coll. Nutr.* **21**:223-232.
- ¹⁷He, P. P., Lv, X. Z. and Wang, G. Y. 2004. Effects of Se and Zn supplementation on the antagonism against Pb and Cd in vegetables. *Environ. Int.* **30**:167-172.
- ¹⁸Hawrylak, N. B. 2008. Effect of selenium on selected micronutrients in maize plants. *J. Elementol.* **13**:513-519.
- ¹⁹Sánchez, E., Rivero, R. M., Ruiz, J. M. and Romero, L. 2004. Changes in biomass, enzymatic activity and protein concentration in roots and leaves of green bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Strike) under high NH_4NO_3 application rates. *Sci Hort.* **99**:237-248.
- ²⁰Pedrero, Z., Madrid, Y. and Cámara, C. 2006. Selenium species bioaccessibility in enriched radish (*Raphanus sativus*): A potential dietary source of selenium. *J. Agr. Food Chem.* **54**:2412-2417.
- ²¹Wolf, B. 1982. A comprehensive systems of leaf analysis and its use for diagnosing crop nutrients status. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* **13**:1035-1059.
- ²²Krom, M. D. 1980. Spectrophotometric determination of ammonia: Study of a modified Berthelot reaction using salicylate and dichloroisocyanurate. *Analyst* **105**:305-316.
- ²³Hogue, E., Wilcox, G. E. and Cantliffe, D. J. 1970. Effect of soil P on phosphate fraction in tomato leaves. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **95**:174-176.
- ²⁴Lachica, M., Aguilar, A. and Yáñez, J. 1973. Análisis foliar. Métodos utilizados en la estación experimental del zaidin. *Ann. Edaf. Agrobiol.* **32**:1033-1047.
- ²⁵Hocking, P. J. and Pate, J. S. 1977. Mobilization of minerals to developing seeds of legumes. *Annals Botany* **41**:1259-1278.
- ²⁶SAS 1987. SAS/STAT Guide for Personal Computers. Version 6; Statistical Analysis System Institute, Inc., Cary, NC, pp. 1028-1056.
- ²⁷Djanaguiraman, M., Durga-Devi, D., Shanker, A. K., Sheeba, J. A. and Bangrusamy, U. 2005. Selenium an antioxidative protectant in soybean during senescence. *Plant Soil* **272**:77-86.
- ²⁸Ellis, D. R. and Salt, D. E. 2003. Plants, selenium and human health. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**:273-9.
- ²⁹Hartikainen, H., Xue, T. and Piironen, V. 2000. Selenium as an antioxidant and pro-oxidant in ryegrass. *Plant Soil* **225**:193-200.
- ³⁰Hernández-Saavedra, D. and McCord, J. M. 2007. Evolución y radicales libres. Importancia del estrés oxidativo en la patología humana. *Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Soc.* **45**:477-484.
- ³¹Zayed, A., Lytle, C. M. and Terry, N. 1998. Accumulation and volatilization of different chemical species of selenium by plants. *Planta* **206**:248-92.
- ³²Hopper, J. L. and Parker, D. R. 1999. Plant availability of selenite and selenate as influenced by the competing ions phosphate and sulphate. *Plant Soil* **210**:199-207.
- ³³Li, H. F., McGrath, S. P. and Zhao, F. J. 2008. Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite. *New Phytol.* **178**:92-102.
- ³⁴Lee, S. J., Kang, H. M. and Kim, I. S. 2008. Effect of sodium selenate supplied condition by fertigation on the growth and content of minerals, ascorbic acid, nitrate, and selenium of some western vegetables. *J. Bio-Environ. Control* **17**:43-50. Available at <http://agris.fao.org/agris-search/search/display.do?f=2010/KR/KR1002.xml;KR2009002931>
- ³⁵Ruiz, J. M. and Romero, L. 1999. Cucumber yield and nitrogen metabolism in response to nitrogen supply. *Sci. Hort.* **82**:309-316.
- ³⁶Khattab, H. 2004. Metabolic and oxidative responses associated with exposure of *Eruca sativa* (Rocket) plants to different levels of selenium. *Int. J. Agri. Biol.* **6**:1101-1106.
- ³⁷Sager, M. and Hoesch, J. 2006. Selenium uptake in cereals grown in lower Austria. *J. Cent. Eur. Agric.* **7**:71-78.
- ³⁸Giehl, R. F., Meda, A. R. and Wiren, N. 2009. Moving up, down, and everywhere: Signaling of micronutrients in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**:320-327.
- ³⁹Fargašová, A., Pastierová, J. and Svetková, K. 2006. Effect of Se-metal pair combinations (Cd, Zn, Cu, Pb) on photosynthetic pigments production and metal accumulation in *Sinapis alba* L. seedlings. *Plant Soil Environ.* **52**:8-15.
- ⁴⁰Ahmen, H. Kh. 2010. Differences between some plants in selenium accumulation from supplementation soils with Selenium. *Agr. Biol. J. N. Am.* **1**:1050-1056.

CAPÍTULO II

BIOFORTIFICATION AND DISTRIBUTION PATTERN OF SELENIUM IN BEAN: RESPONSE TO SELENATE AND SELENITE

Martha A. Hermosillo-Cereceres¹; Esteban Sánchez-Chávez^{1*}; René R. Balandrán-Quintana²; Ana M. Mendoza-Wilson²; Alexandro Guevara-Aguilar¹; Ezequiel Muñoz-Márquez¹; Monica L. García-Bañuelos¹

* esteban@ciad.mx (corresponding author), mhermosillo@estudiantes.ciad.mx, rbalandran@ciad.mx, mwilson@ciad.mx, aguevara@ciad.mx, emunoz@ciad.mx, garciabm@ciad.mx

¹*Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Coordinación Delicias. Av. 4^a Sur 3820. Fraccionamiento Vencedores del Desierto. Cd. Delicias, Chihuahua, C. P. 33089. México.*

²*Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal Hermosillo. Km. 0.6 Carretera a la Victoria. Cd. Hermosillo, Sonora, México. C.P. 83000. Tel. (662) 280 01 46.*

Artículo enviado a: *Journal of Food, Agriculture & Environment*

Abstract

The micronutrient biofortification of agricultural crops is a process of increasing the bioavailable concentrations of essential elements in the edible portions of cultivated plants. Today fertilization is considered a promising strategy to integrate selenium (Se) into crops, as this is efficiently transferred through the soil-plant-animal-human chain. The objective of the present work was to assess the distribution pattern of Se in bean plants according to the different application rates of sodium selenate and selenite in order to biofortify the bean plants with this element and to increase their nutritional value. Six application rates of both nutrients were tested (0, 10, 20, 40, 80, and 160 μM) for 40 d. The results for the conditions studied indicate that the application of Se in the form of selenite at a rate of 40 μM was the most suitable rate to incorporate Se into the bean plant, as it favored growth (biomass) and boosted the bioavailable concentration of Se in the bean fruit. On the other hand, the best application rate for selenate was 20 μM . In addition, the high rates of selenite caused phytotoxicity in the bean crop, provoking a drastic reduction in biomass. It was thus concluded that it is feasible to implement a fertilization program with Se in order to improve the nutritional quality of the bean crop, as the most Se concentrates in the seeds.

Key words: *Phaseolus vulgaris* L., biofortification, selenate, selenite.

1. Introduction

Se is considered an essential micronutrient for human health,^{1,2} because its deficiency can cause cancer³ and thus, with proper ingestion, this element acts as an anti-carcinogenic agent.⁴ In this sense,⁵ indicated that 200 $\mu\text{g dia}^{-1}$ de Se reduces the incidence of lung and prostate cancer. On the other hand, a consumption of 400 $\mu\text{g dia}^{-1}$ can have a harmful effect on health.⁶

Se is necessary for the correct functioning of the immunological system, as it has recognized protective power against viral infections,⁷ given that it is a component of selenoproteins, which play a key role in antioxidant defense,⁸ the daily requirement being 50-70 $\mu\text{g dia}^{-1}$.⁹ Se deficiency in humans results from the low quantity of this element in most soils of the world, which is problematic, as the main source of Se in any food-production system is the soil.¹⁰ On this basis, the effect of Se in plants has been studied in different crops under biofortification programs.

Biofortification is defined as the process of increasing the bioavailable concentrations of essential elements in the edible portions of cultivated plants through agricultural management (fertilization) or genetic improvement.¹¹ Some of the most recently studied crops in biofortification programs with Se are: green tea,¹² onion,¹³ lettuce,¹⁴ and wheat,^{15,16} for which the results demonstrate that fertilization with Se increases the bioavailable content of this nutrient in plants.

However, despite the demonstrated effectiveness of these programs, few studies have compared the two forms of inorganic Se (selenate and selenite), related with the nutritional improvement of crops. Currently it is known that selenite is more toxic for the plant than selenate, due possibly to the rapid conversion of selenite to seleno-amino acids, which are incorporated into the plants, replacing sulfur (S) and causing a toxic effect to the plant.¹ A recent work by Ríos *et al.*¹⁴ analyzing this aspect in lettuce has demonstrated differences in the plant response depending both on the application rate as well as on the chemical species of Se supplied.

Due to the importance of Se in human health, and that bean is a fundamental food crop worldwide, the aim of the present work is to examine the distribution pattern of total Se in bean plants according to the different application rates of sodium selenate and selenite as a means of biofortifying bean plants with this mineral and increasing their nutritional value.

2. Materials and methods

Crop management and experimental design: Plants of bean (*Phaseolus vulgaris* L., cv. Strike) were germinated and grown in a mixture of substrate (peat, vermiculate, and perlite at a proportion of 3:1:1) in pots of 30 cm in diameter, in an experimental greenhouse located in Delicias, Chihuahua (Mexico), at an average temperature of $25 \pm 4^\circ\text{C}$ inside the greenhouse. Throughout the crop cycle, the plants received a nutrient solution composed of 6 mM of NH_4NO_3 , 1.6 mM de K_2HPO_4 , 2.4 mM de K_2SO_4 , 4.0 mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.4 mM de MgSO_4 , 5 μM de Fe-EDDHA, 2 μM de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.0 μM de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.25 μM of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.3 μM of $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, and 0.5 μM of H_3BO_3 prepared with distilled water.¹⁷ The pH of the solution ranged from 5.5 to 6.0 and the electrical conductivity was 2.7.

The sources of Se used were Na_2SeO_3 and Na_2SeO_4 , at concentrations de 0, 10, 20, 40, 80, and 160 μM , which were added for to a nutrient solution for 40 days beginning 20 d after sowing. The experimental design was complete random with six treatments of selenite and six of selenate with four replicates per treatment.

Plant sampling: The plants were sampled 60 d after germination, when they were in the phenological stage of full development and fruit ripeness. The different plant organs were separated (into leaf, root, stem, petiole, seed, and pod) and washed three times with tap water and once with deionized water. Afterwards, the samples were dried with filter paper and left 24 h to lose moisture and then were placed in an oven at 48 h at 50°C until the material was completely dry.

Determination of selenium: For the determination of the Se concentration, 25 mg of the sample were digested with 2.5 mL of concentrated HNO_3 and 1 mL of H_2O_2 in a

microwave oven. The resulting solution was diluted in 25 mL of deionized water and the Se concentration was determined by ICP-MS (inductive coupling plasma mass spectrometry) as in Pedrero *et al.*¹⁸

All the data were submitted to an analysis of variance. For the difference between the means of the treatments, the LSD test was used at 95%.¹⁹

3. Results and discussion

Under adverse conditions, one of the most reliable indicators of stress in plants is biomass production.²⁰ In this sense, Se yields a strong impact on the biomass of plants according to the inorganic form applied (selenate or selenite), which can decrease or increase the content of this nutrient.^{21,14} The results found significantly differ in the total-biomass accumulation with the different application rates and Se forms (selenate and selenite), showing greater biomass reduction in the treatment with the high selenite concentration (160 μM ; Fig. 1), where a total-biomass decline of 45.7% was found with respect to control. This is attributed to a toxic effect of Se, possibly because the plants such as bean are not hyperaccumulators of Se and thus could lack a detoxification system for this element, which thus cannot be eliminated by methylation and volatilization.²² The most effective application rate was 20 μM , resulting in an increase of 5% over control. In the case of selenite, the best treatment was 10 μM , as it did not lower total biomass production with respect to control.

In terms of biomass accumulation in the different plant organs studied, significant differences were found ($P \leq 0.05$, Fig. 2) with respect to the different application rates and Se source applied (selenite and selenate). The petiole was the only organ that registered a decline in biomass for all the rates and sources of Se with respect to control. In response to selenite, the only rate that prompted increases in pod, stem, leaf, and root biomass was 10 μM , whereas with respect to seed production, the rate that most promoted biomass growth was 40 μM , with a 20.2% increase in relation to control.

With the selenate application (Fig. 2), the highest application rate (160 μM) favored biomass production in three plant organs (stem, leaf, and root) with the

greatest increase in leaf (55.9 %) with respect to control. However, for fruit production (seed and pod), the greatest increase was recorded at the rate of 20 μ M.

The results indicate that selenate was a less toxic form than selenite, since the high application rates of the former prompted biomass increases in some of the organs studied. This coincides with the results of Ríos *et al.*¹⁴ who found that high selenate rates resulted in greater biomass accumulation in lettuce crops in comparison with high rates of selenite. However, Sharma *et al.*²³ found that selenite boosted total biomass production more than did selenate in rapeseed (*Brassica napus*) indicating that the influence of Se on biomass in crops is related to the capacity of the plant to tolerate different quantities and sources of Se without suffering phytotoxicity.

The toxic effect of Se in plants appears to be the result of the fact that at high application rates, this nutrient acts as a pro-oxidant, encouraging the production of lipid peroxy radicals (LOO \cdot),²⁴ which causes breaks in the DNA chains and indiscriminately oxidizes any organic molecule,²⁵ causing cell death in plant tissues.

The translocation of Se from the root to the upper part of the plant depends on the way in which this nutrient is supplied, selenate being far more easily transported than is selenite.²⁶ A biofortification program using this element is limited by the plant's capacity for Se accumulation. Our results show significant differences in Se accumulation ($P \leq 0.05$, Figure 3), since selenate favors greater accumulation of Se compared with selenite in five of the six organs analyzed (leaf, stem, petiole, pod, root), presumably because selenite follows the pathway of phosphate transporters in the roots, and therefore is a dependent metabolically active process and also has low mobility through the xylem.¹⁵ In the seeds, a greater Se concentration was found on applying selenite. Therefore, the best rates to biofortify the bean crop with Se were: 40 μ M of selenite and 20 μ M of selenate, as these rates favored plant growth (greater biomass accumulation) and augmented the Se concentration in the fruit.

As mentioned above, Se is absorbed by plants more efficiently when it is applied as selenate in comparison to selenite,²⁷ as reflected by our results, where the highest

increase was 96.8% in the root at the rate of 80 μM of selenate in relation to 10 μM . The rate of 160 μM of selenate was favorable for greater Se accumulation only in the stem and petiole, while the rate of 80 μM encouraged more accumulation in the pod and root. In the leaves and seeds, the best rate was that of 40 μM . However, in general, the petiole was the organ that presented the lowest Se accumulation. Pickering *et al.*²⁸ studied the effect of selenate application in *Astragalus bisulcatus*, a plant that hyperaccumulates Se, and found that the petiole presented the least Se accumulation, probably because the petiole has a function of water and nutrient conduction.

The distribution pattern of Se shows that at all the application rates studied and in both forms applied (selenate and selenite), the highest Se concentration occurred in seeds (Fig. 4), in agreement with Li *et al.*¹⁵ who found that 90% of the Se applied was transported to the fruit in a wheat crop. This is important in a biofortification program, given the role of Se in human health.⁵

4. Conclusions

The results of the present study indicate that Se application in the form of selenite at 40 μM was the best rate to biofortify the bean plant, as it favored plant growth (biomass) and increased the bioavailable concentration of Se in the seed. Meanwhile, the best rate for selenate proved to be 20 μM . In addition, the high selenite rates caused phytotoxicity in bean, provoking a drastic reduction in biomass. Finally, we conclude that it is feasible to implement a biofortification program with Se to improve the nutritional quality of the bean crop, as Se concentrates mostly in the seeds.

5. Acknowledgments

This work was financed by the project of Ciencia Básica 081055 funded by CONACYT. Also, we would like to thank CONACYT for the grant awarded to Martha Aracely Hermosillo Cereceres to carry out her doctoral studies within the CIAD doctoral program.

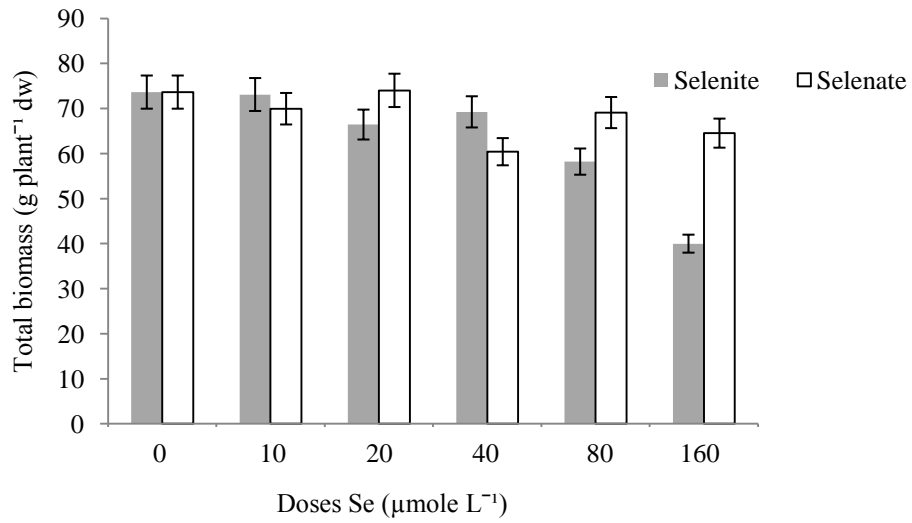


Figure 1. Production of total biomass (expressed in grams of d.w.) of the bean plant cv Strike in response to different application rates of selenate and selenite. The data are means \pm standard error (n=4).

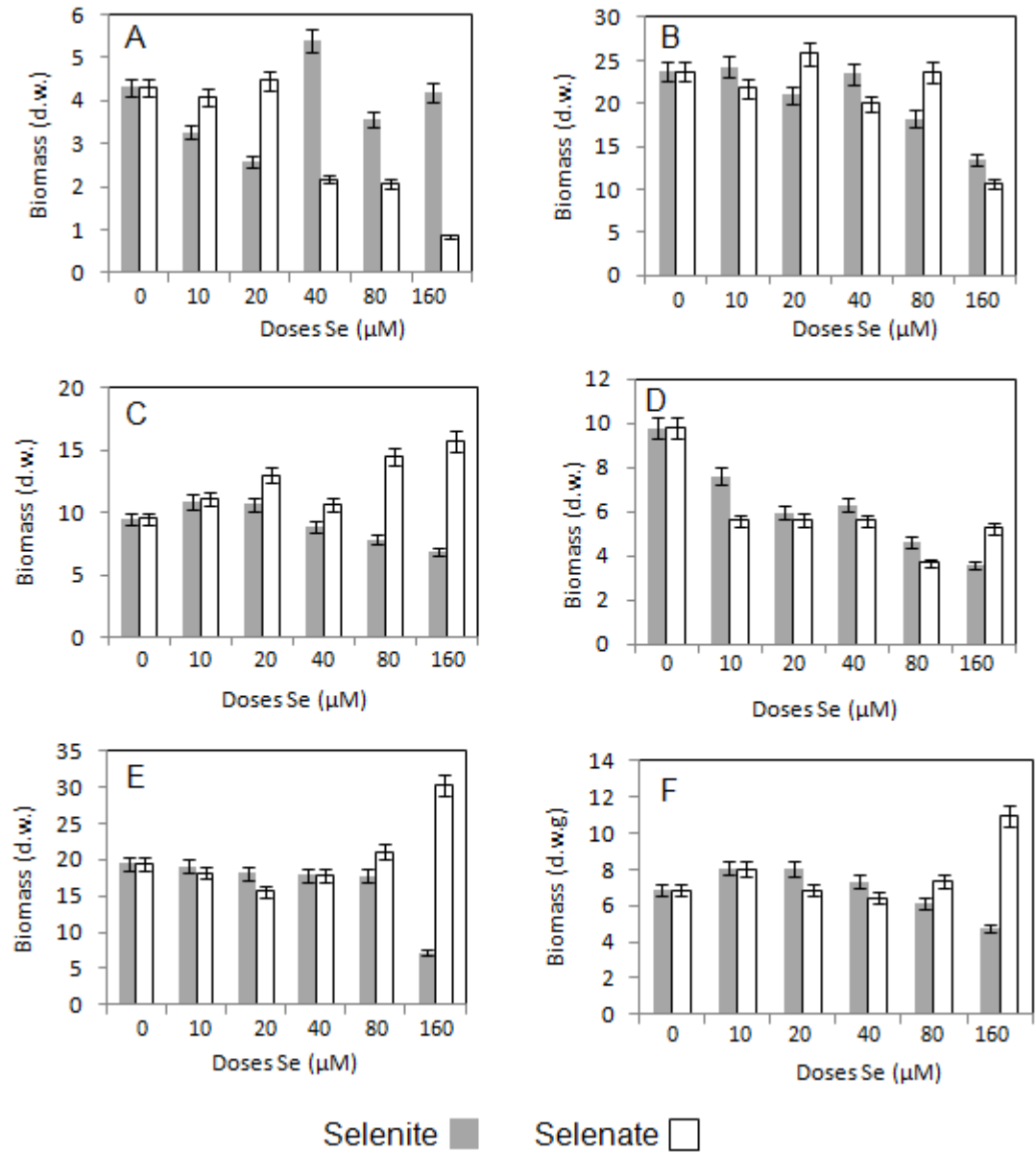


Figure 2. Biomass production (expressed in grams of d.w.) in the different organs studied in the bean plant of bean cv Strike: Seed (A), Pod (B), Stem (C), Petiole (D), leaf (E), and root (F) in response to different application rates of selenate and selenite. The data are \pm standard error (n=4).

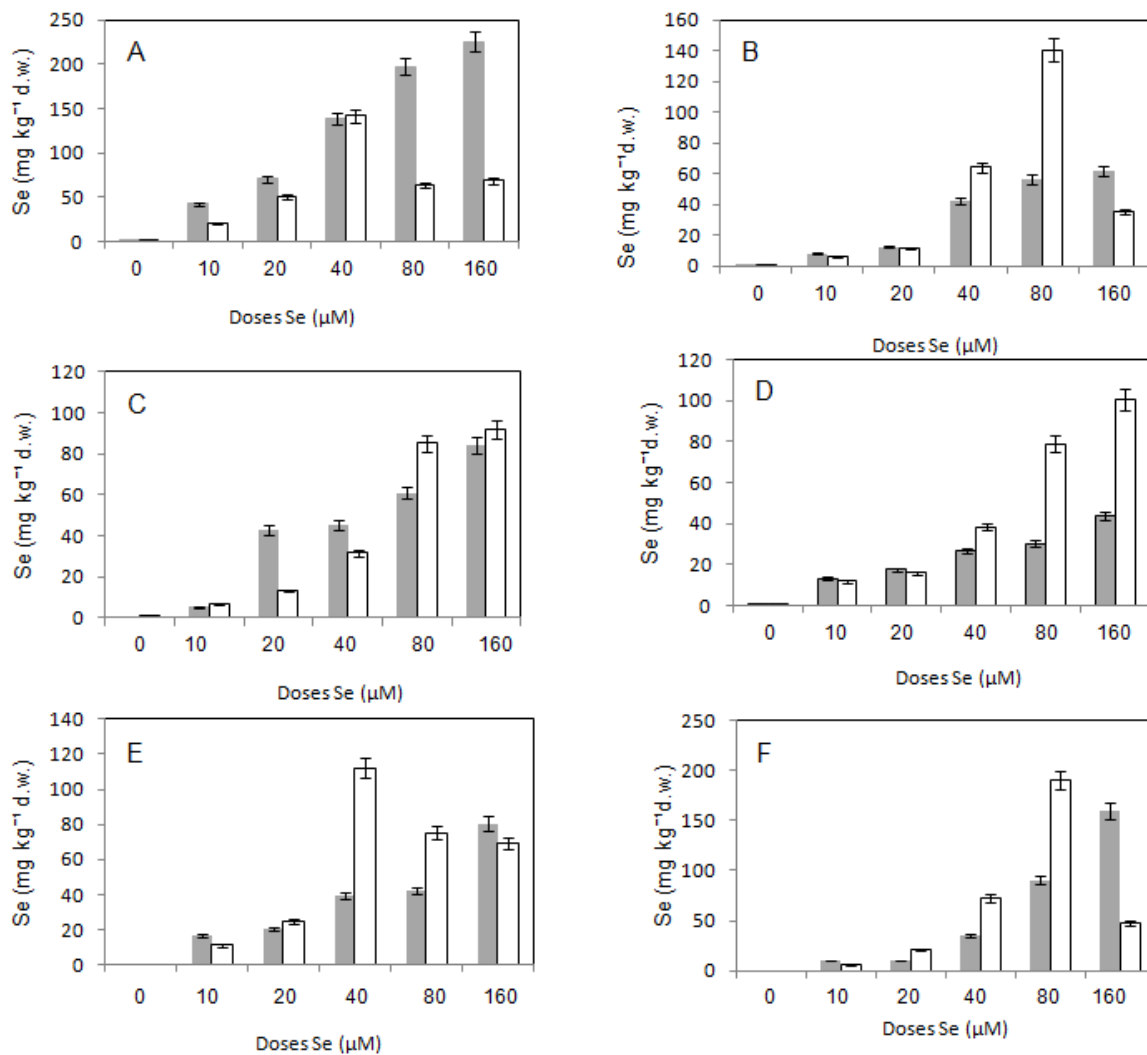


Figure 3. Concentration Se (expressed in mg kg⁻¹ of d.w.) in the different organs studied in the bean plant of bean cv Strike: Seed (A), Pod (B), Stem (C), Petiole (D), leaf (E), and root (F) in response to different application rates of selenate and selenite. The data are ± standard error (n=4).

Selenite vs Selenate

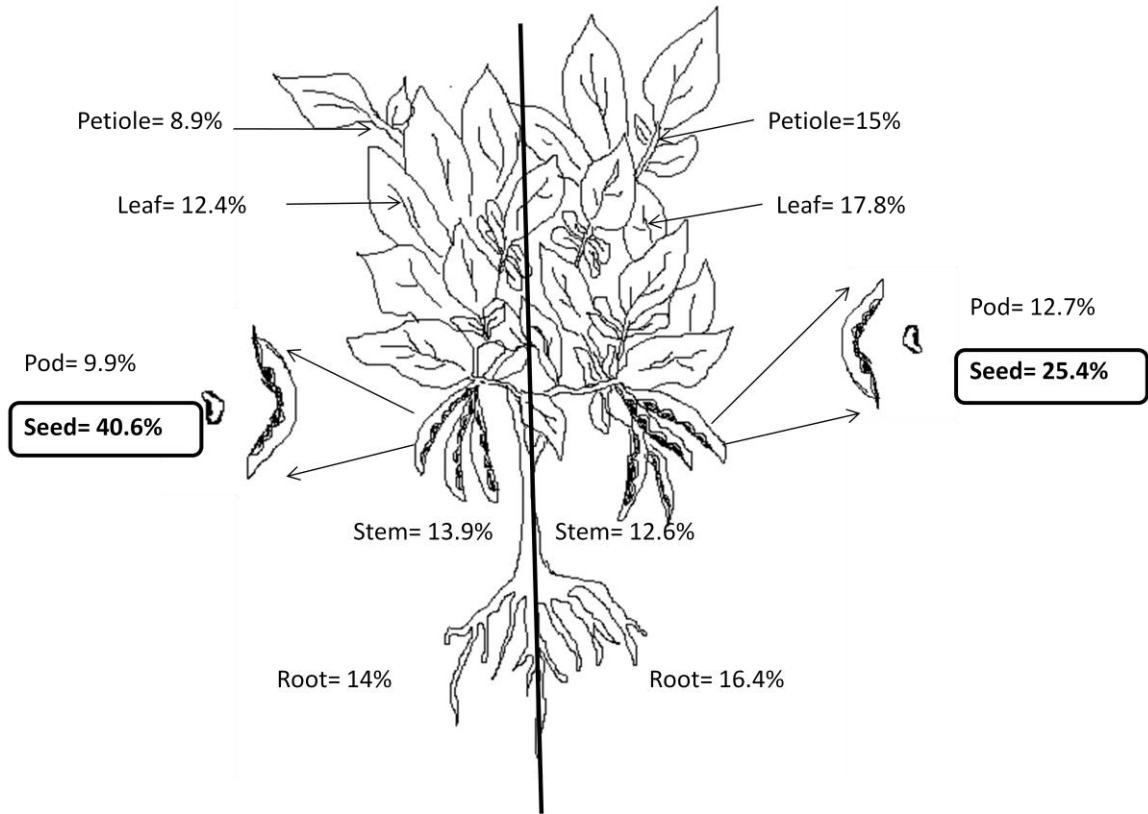


Figure 4. Distribution pattern of Se in bean plants according to the form of Se applied (selenate vs. selenite).

6. References

- ¹Terry, N., Zayed, A. M., De Souza, M. P. and Tarun, A. S. 2000. Selenium in higher plants. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**:401-432.
- ²Zeng, H. and Combs, G. F. 2008. Selenium as an anticancer nutrient: roles in cell proliferation and tumor cell invasion. *Journal of Nutritional Biochemistry* **19**:1-7.
- ³Irmak, M. B., Ince, G., Ozturk, M. and Cetin-Atalay, R. 2003. Acquired Tolerance of Hepatocellular Carcinoma Cells to Selenium Deficiency: A Selective Survival Mechanism? *Cancer Research* **63**:6707-6715.
- ⁴Rayman, M. P. 2000. The importance of selenium to human health. *Lancet* **356**: 233-241.
- ⁵Duffield, L. A. J., Reid, M. E., Turnbull, B. W., Combs, G. F., Slate, E. H., Fischbach, L. A., Marshall, J. R. and Clark, L. C. 2002. Baseline characteristics and the effect of selenium supplementation on cancer incidence in a randomized clinical trial: a summary report of the Nutritional Prevention of Cancer Trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prevention* **11**:630-639.
- ⁶DRI. 2000. National Research Council, Washington: National Academy Press. pp. 284-319.
- ⁷Manzanares, C. W. 2007. Selenio en los pacientes críticos con Respuesta Inflamatoria Sistémica. *Nutrición Hospitalaria* **22**:295-306.
- ⁸Lu, J. and Holmgren, A. 2009. Selenoproteins minireview. *The Journal of Biological Chemistry* **284**:723-727.
- ⁹USDA. 2003. Dietary reference intakes: Elements. <http://www.nap.edu>. 15 June 2010.
- ¹⁰Combs, G. F. 2001. Selenium in global food systems. *British Journal of Nutrition* **85**:517-547.
- ¹¹White, P. J. and Broadley, M. R. 2005. Biofortifying crops with essential mineral elements. *Trends in Plant Science* **10**:586-593.
- ¹²Xu, J., Zhu, S., Yang, F., Chang, L., Hu, Y., Pan, G., and Hu, Q. 2003. The influence of selenium on the antioxidant activity of green tea. *Journal of Science Food Agricultural* **83**: 451-455.
- ¹³Yadav, S., Gupta, S., Prakash, R., Spallholz, J. and Prakash, N. T. 2007. Selenium uptake by *Allium cepa* Grown in Se-spiked soils. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science* **2**:80-84.

- ¹⁴Ríos, J. J., Rosales, M. A. Blasco, B., Cervilla, L. M., Romero, L. and Ruiz, J. M. 2008. Biofortification of Se and induction of the antioxidant capacity in lettuce plants. *Scientia Horticulturae* **116**:248-255.
- ¹⁵Li, H., McGrath, S. P. and Zhao, F. J. 2008. Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite. *New Phytologist* **178**: 92-102.
- ¹⁶Ducsay, L., Lozek, O. and Varga, L. 2009. The influence of selenium soil application on its content in spring wheat. *Plant, Soil and Environment* **55**:80-84.
- ¹⁷Sánchez, E., Rivero, R. M., Ruiz, J. M. and Romero, L. 2004. Changes in biomass, enzymatic activity and protein concentration in roots and leaves of green bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Strike) under high NH_4NO_3 application rates. *Scientia Horticulturae* **99**:237-248.
- ¹⁸Pedrero, Z., Madrid, Y. and Camara, C. 2006. Selenium species bioaccessibility in enriched radish (*Raphanus sativus*): A potential dietary source of selenium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**:2412-2417.
- ¹⁹SAS. 1987. SAS/STAT Guide for personal computers. Version 6; Statistical Analysis System Institute, Inc. Cary, North Carolina p. 1028-1056.
- ²⁰Fu, J. and Huang, B. 2001. Involvement of antioxidant and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Environmental and Experimental Botany*. **45**: 105-114.
- ²¹Djanaguiraman, M., Devi, D. D., Shanker, A. K., Sheeba, J. A. and Bangrusamy, U. 2005. Selenium an antioxidative protectant in soybean during senescence. *Plant and Soil* **272**:77-86.
- ²²Ellis, D. R. and Salt, D. E. 2003. Plants, selenium and human health. *Current Opinion in Plant Biology* **6**:273-279.
- ²³Sharma, S., Bamsal, A., Surjit, K. D. and Dhillon, K. S. 2010. Comparative effects of selenate and selenite on growth and biochemical composition of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Plant and Soil* **329**:339-348.
- ²⁴Hartikainen, H. and Piironen, X. T. 2000. Selenium as an antioxidant and pro-oxidant in ryegrass. *Plant and Soil* **225**:193-200.
- ²⁵Hernández, S. D. and McCord, J. M. 2007. Evolución y radicales libres. Importancia del estrés oxidativo en la patología humana. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social* **45**:477-484.
- ²⁶Zayed, A., Lytle, C. M. and Terry, N. 1998. Accumulation and volatilization of different chemical species of selenium by plants. *Planta* **206**:248-292.

- ²⁷De Souza, M. P., Lytle, C. M., Mulholland, M. M., Otte, M. L. and Terry, N. 2000. Selenium Assimilation and volatilization from Dimethylselenoniopropionate by Indian Mustard. *Plant Physiology* **122**:1281-1288.
- ²⁸Pickering, I., Prince, R. C., Salt, D. E. and Graham, N. G. 2000. Quantitative, chemically specific imaging of selenium transformation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**:10717-10722.

CAPÍTULO III

NITROGEN METABOLISM, BIOMASS AND YIELD RESPONSE OF GREEN BEAN PLANTS TO SELENIUM FERTILIZATION

M. A. Hermosillo-Cereceres; E. Sánchez-Chávez[¶]; A. Guevara-Aguilar; E. Muñoz-Márquez.

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Coordinación Delicias. Av. 4ª Sur 3820. Fraccionamiento Vencedores del Desierto. Cd. Delicias, Chihuahua, C. P. 33089. MÉXICO. Correo-e: esteban@ciad.mx ([¶]Autor responsable)

Artículo enviado a: **Revista Chapingo Serie Horticultura**

DR. ESTEBAN SANCHEZ CHAVEZ
AUTOR RESPONSABLE
P R E S E N T E.

Con el objetivo de que realicen las correcciones pertinentes, resultado del proceso de arbitraje le estamos enviando el artículo titulado: "NITROGEN METABOLISM, BIOMASS AND YIELD RESPONSE OF GREEN BEAN PLANTS TO SELENIUM FERTILIZATION" Clave: 2010.10.60 cuyos autores son: M. A. Hermosillo-Cereceres; E. Sánchez-Chávez; A. Guevara-Aguilar; E. Muñoz-Márquez, el cual nos fue remitido para su revisión y posible publicación. Le suplicamos devolver el artículo ya corregido, en un plazo no mayor de 10 días hábiles después de la fecha de recibido. Así mismo le pedimos enviar (CD) e impreso que contenga la versión corregida en Word 6.0 ó superior.

Sin más por el presente me despido reiterándole un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E



DR. ESAU DEL CARMEN MORENO PÉREZ
EDITOR PRINCIPAL DE LA REVISTA
CHAPINGO SERIE HORTICULTURA

ABSTRACT

The objective of this research was to study the nitrogen metabolism, biomass accumulation and yield of bean plants as a function of the application of different doses and forms of selenium. Six doses of sodium selenate and selenite were tested (0, 10, 20, 40, 80 and 160 μM) during 40 days. The results indicate that the application of Se in the form of selenate had a positive effect on the nitrogen metabolism, biomass accumulation and yield increase; therefore, Se could be incorporated in a program of micronutrient biofortification in bean. Selenate was less toxic than selenite. Doses of 40 μM selenite and 20 μM selenate were the concentrations most adequate to biofortify bean plants.

ADDITIONAL KEY WORDS: *Phaseolus vulgaris* L., selenium, nitrogen assimilation.

**METABOLISMO NITROGENADO, BIOMASA Y RENDIMIENTO
RESPUESTA DE LAS PLANTAS DE FRIJOL A LA FERTILIZACIÓN CON
SELENIO**

**M. A. Hermosillo-Cereceres; E. Sánchez-Chávez[¶]; A. Guevara-Aguilar; E. Muñoz-
Márquez.**

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Coordinación Delicias. Av.
4^a Sur 3820. Fraccionamiento Vencedores del Desierto. Cd. Delicias, Chihuahua, C. P.
33089. MÉXICO. Correo-e: esteban@ciad.mx ([¶]Autor responsable)

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el metabolismo nitrogenado, biomasa y el rendimiento en plantas de frijol en función de la aplicación de diferentes dosis y formas de selenio. Seis dosis de selenato y selenito de sodio fueron probadas (0, 10, 20, 40, 80 y 160 μM) durante 40 días. Los resultados de este estudio indican, que la aplicación de Se en forma de selenato tuvo un efecto positivo sobre el metabolismo nitrogenado, acumulación de biomasa e incremento del rendimiento, por lo que se puede incorporar al Se en un programa de biofortificación de micronutrientes en frijol. El selenato fue menos tóxico que el selenito. La dosis de 40 μM de selenito y 20 μM de selenato fueron las más adecuadas para biofortificar a la planta de frijol.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: *Phaseolus vulgaris* L., selenium, nitrogen assimilation.

INTRODUCTION

Beans are grown and consumed in nearly all the World. In many developing countries, 20% of the available protein is provided by beans. Beans also represent an integral part of dietary protein for 50 % of the world's population (Deshpande *et al.*, 1984) Beans are produced in large quantities in the American Continent and East Africa (Singh, 1999).

Plant growth is dependent on an adequate nitrogen (N) supply in order to form amino acids, proteins, nucleic acids and other cellular constituents. For most plants, inorganic N is obtained from the soil in the form of nitrate (NO_3^-). It has long been recognised that the rate-limiting step for N assimilation, the reduction of NO_3^- to nitrite (NO_2^-) catalysed by nitrate reductase (NR), is highly regulated (Sivasankar and Oaks, 1996). Nitrate availability, growth regulators, light, products of NO_3^- assimilation and other physiological and environmental parameters are all factors in regulation of NO_3^- assimilation (Ruiz and Romero, 1999).

The availability, absorption, and distribution of nutrients in plants are the most determinant factors in the formation and distribution of biomass, in turn affecting the survival and competitiveness of plants as well as yield in crops. Plant biomass formation results primarily from the processes of assimilation of N and carbon (C), from the distribution of products resulting from these processes, and from the loss of these elements through respiration, exudation, and cell death (López-Lefebvre *et al.*, 2002).

To date, Selenium (Se) has not been described as an essential element for plants (Ríos *et al.*, 2008), although in recent years the relationship of this element to plant

growth and metabolism has been studied, raising the possibility of the essential nature of Se (Liu *et al.*, 2004).

However, despite this importance, research in this regard is scant. The most notable studies refer primarily to the antagonistic relationship between Se and Sulphur (S) (Barak and Goldman, 1997; Kopsell, 1997; Ríos *et al.*, 2008).

Given its essential nature in humans together with the marked development in biofortification programmes that use Se (Ríos *et al.*, 2008), it is indispensable to study the relationships between this trace element and different essential nutrients with the aim of designing effective biofortification programmes in different crops. Therefore, the aim of the present work was to evaluate the influence that Se application at different rates and forms exerts on the nitrogen metabolism, biomass and yield of bean plants.

MATERIALS AND METHODS

Crop design and plant sampling

Seeds of *Phaseolus vulgaris* L., cv. Strike were germinated and grown in a substrate mix (peat moss, vermiculite and perlite at a ratio 3:1:1) in 30-cm in a research greenhouse in Delicias, Chihuahua, México, at a mean temperature of 25 ± 4 °C inside the greenhouse. During all the growing cycle the bean plants received a nutrient solution with 6 mM NH_4NO_3 , 1.6 mM K_2HPO_4 , 2.4 mM K_2SO_4 , 4.0 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.4 mM MgSO_4 , 5 μM Fe-EDDHA, 2 μM $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.0 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.25 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.3 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ and 0.5 μM H_3BO_3 (pH 5.5-6.0) (Sánchez *et al.*, 2004).

The different Se treatments (Na_2SeO_3 and Na_2SeO_4) at doses of 0, 10, 20, 40, 80 and 160 μM were applied in the nutrient solution, beginning 20 days after sowing and during 40 days henceforth. A completely randomized experimental design was used, with six treatments of selenite and selenate, respectively, and four replications per treatment.

The plants were sampled at 60 days after sowing, at full pod development. All the leaf samples were taken in the mature state. The material was rinsed three times in distilled water after disinfection with a non-ionic detergent at 1 % (Wolf, 1982), then blotted on filter paper. At each sampling, fresh leaf matter were used for the analysis of Nitrate Reductase activity (NR) and soluble proteins. A leaf subsample was dried in a forced-air oven at 70 °C for 24 h, ground in a Wiley mill and then placed in plastic bags until analysis for total N. All determinations were performed in triplicate.

Plant analysis

Determination of *in vivo* Nitrate Reductase activity

The basic method was an adaptation of the *in vivo* Nitrate Reductase (NR) assay of Jaworsky (1971) and Mauriño *et al.* (1986). Leaves were cut into 7 mm sections and the sample (0.5 g) was placed in 10 ml of incubation buffer (100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5), 25 mM KNO_3 and 1 % (v/v) propanol. The sample was infiltrated and the intracellular spaces of the tissues were flushed with buffer under a vacuum (0.8 bar). After 10 min the vacuum was released and the samples were re-evacuated. The samples were incubated at 30°C in darkness for 1 h and placed in a boiling water bath to stop the NR activity. The resulting NO_3^- was measured by the method of Ruiz and Romero (1999) and the NR activity was expressed as $\mu\text{mol NO}_3^- \text{ g}^{-1}$ fresh weight (FW) h^{-1} .

Soluble protein determination

Fresh leaf samples (0.5 g) were crushed with 5 ml of cold phosphate buffer (50 mM KH_2PO_4 , pH 7) and centrifuged at 3000 g for 10 min. The resulting supernatant was used for the determination of soluble proteins using Bradford G-250 reagent (Bradford, 1976) and expressed as mg bovine serum albumin g^{-1} FW.

Total N determination

A 0.1 g dry weight subsample was digested with 12 M H_2SO_4 and H_2O_2 (Wolf, 1982). After dilution with deionised water a 1 ml aliquot of the digest was added to the reaction medium containing buffer (5% potassium sodium tartrate, 100 μM sodium phosphate and 5.4% (w/v) sodium hydroxide), 15%/0.03% (w/v) sodium salicylate/sodium nitroprusside and 5.35% (v/v) sodium hypochlorite. Samples were incubated at 37°C for 15 min and total N was measured by spectrophotometry according to Baethgen and Alley (1989). The results were expressed as % DW.

Biomass

Dry weight (DW) was recorded and expressed as mg DW per root or per leaf.

Yield

Yield was expressed as the mean fruit weight per plant. Collected beans were weighed on each plant at sampling. Commercial yield (kg per plant) represents fruit with acceptable colour and calibre.

Statistical analysis

Data were analyzed using ANOVA (SAS, 1987). When F tests were significant, differences between treatment means were compared using LSD at the 0.05 probability level. Also, correlation analyses were made between the different variables. Levels of significance were represented by * at $p < 0.05$, ** at $p < 0.01$, *** at $p < 0.001$, and NS: not significant. Data shown are mean values \pm SE.

RESULTS AND DISCUSSION

Selenium (Se) is a micronutrient essential for people, animals and some microorganisms. Although all plants are able to take up and metabolize selenium, the assumption about its necessity for higher plants has not been fully confirmed yet (Feng *et al.*, 2009). In our study, the 80 and 160 μM selenate treatments showed the largest production of foliar biomass, being 8.9 % and 50 % higher, respectively, when compared to the control ($P \leq 0.05$; Figure 1); meanwhile, the dose of 160 μM selenite, induced a drastic reduction in foliar biomass, with a 37 % decrement when related to the control. This effect could be explained by the competition of Se at high concentrations with sulphur (S) in some biochemical processes such as that of assimilation into amino acids of essential proteins (White *et al.*, 2004).

The results obtained here indicate that the selenate form is less toxic than the selenite, because the high levels of selenate increased shoot biomass; this finding is in agreement with the results reported by Ríos *et al.* (2008) who found that high doses of

selenate induced a larger biomass accumulation in lettuce than that obtained with high doses of selenite.

The translocation of Se from the root to the aerial part of a plant depends on the chemical form of the Se supplied, being selenate transported in a much more easier way than selenite (Zayed *et al.*, 1998). When applying a biofortification program, there is a potential concern for the effect of Se on plant yield. Our results show significant differences in the production of bean pods among treatments ($P \leq 0.05$, Figure 2), being selenate which favored the biggest production of bean pods, with the doses of 20 and 40 μM of selenate y selenite standing out, respectively; however, the higher doses of selenate y selenite caused a strong reduction of bean pod production. The toxic effect of Se at high doses in plants is probably due to its pro-oxidant role, favoring the production of lipidic-peroxide radicals ($\text{LOO}\cdot$) (Hartikainen and Piironen, 2000), which cause DNA breakage and non-selectively oxidize any organic molecule (Hernández and McCord, 2007).

In general, the best doses of Se for the bean crop were: 40 μM selenite and 20 μM de selenate, since these doses favored plant growth (larger biomass accumulation) and also increased the production of bean pods.

As previously indicated, plant growth depends on adequate N supply to form amino acids, proteins, nucleic acids and other cellular constituents. Many studies have proved that the limitant stage for N assimilation is the reduction of NO_3^- to NO_2^- catalised by the enzyme NR (Huber *et al.*, 1996; Sivasankar and Oaks, 1996, Sánchez *et al.*, 2004). In the present experiment, the NR activity *in vivo* presented significant differences as a

function of the form and application dose of Se ($P \leq 0.05$; Figure 3), with the doses between 10 and 40 μM selenate registering the maximum NR activity as compared to the 80 and 160 μM doses which presented the minimum activities, with decrements of 67 % and 64 % respectively; meanwhile, the concentrations of 80 and 160 μM selenite showed the maximum NR when compared to the control. These effects could be due to the close relationship between the nutritional status of nitrogen and sulphur in plants (Reuveny et al., 1980), since the demand for sulphur depends on the amount of nitrogen supplied. In the same way, there is a relationship between sulphur and Se, because these elements are chemically alike and they compete in biochemical processes for their assimilation in aminoacids and proteins (White et al., 2004).

The final products of N assimilation in plants are mainly aminoacids, proteins and N organic (Barneix and Causin, 1996). The present data show that the highest concentration of N was found in plants treated with 20 μM selenite and 80 μM selenate ($P \leq 0.05$, Figure 4), which coincides with the maximum foliar biomass at low doses of selenite and high doses of selenate. With regard to bean fruit production, low doses of Se (20 μmol selenite and 40 μmol de selenate) presented the highest increments. Similarly, the biggest protein production occurred in treatments with 20 μmol selenite and selenate, respectively ($P \leq 0.05$, Figure 5); this finding confirms the aforementioned influence of nitrogen on protein synthesis. The result of the incorporation of NH_4^+ can be quantified by the analysis of reduced N, which is generally the product of N assimilation and is formed mainly by amino acids and proteins. The total N, the result of the sum of the total reduced N and the NO_3^- , is considered a critical parameter to determine the nutritional state of plants, and productivity growth (Ruiz and Romero, 1999).

Base on these results it is stated that there is a positive relationship between Se and N metabolism in bean plants, presenting a synergism when Se is provided as selenate. It was in this form of Se that occurred both the largest biomass production and the highest N concentrations as well as the biggest bean production, being superior than the control in most of the studied doses. These findings allow us to propose the utilization of Se in a biofortification program, given his benefits to human health derived from his antioxidant effects (Combs, 2001; Manzanares, 2007).

CONCLUSIONS

In general, the application of Se in the form of selenate had a positive effect on the nitrogen metabolism, biomass accumulation and yield increase; therefore, Se could be incorporated in a program of micronutrient biofortification in bean. Selenate was less toxic than selenite. Doses of 40 μ M selenite and 20 μ M selenate were the concentrations most adequate to biofortify bean plants.

LITERATURE CITED

- BAETHGEN, W. E.; ALLEY, M. M. 1989. A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 20: 961-969.
- BARAK, P.; GOLDMAN, I. L. 1997. Antagonistic relationship between selenate and sulphate uptake in onion (*Allium cepa*): Implication for the production of organosulfur and organoselenium compounds in plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45: 1290-1294.
- BARNEIX, A. J.; CAUSIN, H. F. 1996. The central role of amino acids on nitrogen utilization and plant growth. *Journal of Plant Physiology*. 149: 358-362.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254.
- COMBS, G. F. 2001 Selenium in global food systems. *British Journal Nutrition*. 85: 517-547.
- DESHPANDE, S.; STYHE, S. K.; SALUNKHE, D. K. 1984. Interrelationships between certain physical and chemical properties of dry bean. *Qual. Plant Foods for Human Nutrition*. 34: 53-65.
- FENG, R. C.; WEI, S T.; WU, F. 2009. Effects of Se on the uptake of essential elements in *Pteris vittata* L. *Plant and Soil* 325:123-132.

- HARTIKAINEN, H.; PIIRONEN, X. T. 2000. Selenium as an antioxidant and pro-oxidant in ryegrass. *Plant and Soil* 225: 193-200.
- HERNÁNDEZ, S. D.; McCORD, J. M. 2007. Evolución y radicales libres. Importancia del estrés oxidativo en la patología humana. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 45:5:477-484.
- HUBER, S. C.; BACHMANN, M; HUBER, J. L. 1996. Post-translational regulation of nitrate reductase activity: a role for Ca^{2+} and 14-3-3 proteins. *Trends in Plant Science*. 1:432-438.
- JAWORSKY, E.G. 1971. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 43(6): 1274-1279.
- KOPSELL, D. A.; RANDLE, W. M. 1997. Selenate concentration affects selenium and sulfur uptake and accumulation by “Granex” onions. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 122: 721-726.
- LIU, Q.; WANG, D. J.; JIANG, X. J.; CAO, Z. H. 2004. Effect of the interaction between selenium and phosphorus on the growth and selenium accumulation in rice. *Environmental on Geochemistry and Health*, 26: 325-330.
- LOPEZ-LEFEBRE, L. R.; RIVERO, R. M.; GARCÍA, P. C.; SÁNCHEZ, E.; RUIZ, J. M.; ROMERO, L. 2002. Boron effect on mineral nutrients of tobacco. *Journal of plant nutrition* 25: 3: 509-522.
- MANZANARES, C. W. 2007. Selenio en los pacientes críticos con respuesta inflamatoria sistémica. *Nutr Hosp*. 22: 3: 295-306.

- MAURIÑO S. G.; ECHEVARRIA, C; MEIJAS, J. A.; VARGAS, M. A.; MALDONADO, J. M. 1986. Properties of the *in vivo* nitrate reductase assay in maize, soybean, and spinach leaves. *Journal of Plant Physiology* 124:123-130.
- REUVENY, Z.; DOUGALL, D. K.; TRINITY, P. M. 1980. Regulatory coupling of nitrate and sulfate assimilation pathways in cultured tobacco cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 77: 6670-6672.
- RÍOS, J. J.; ROSALES, M. A.; BLASCO, B.; CERVILLA, L. M.; ROMERO, L.; RUIZ, J. M. 2008. Biofortification of Se and induction of the antioxidant capacity in lettuce plants. *Scientia Horticulturae* 116: 248-255.
- RUIZ, J. M.; ROMERO, L. 1999. Cucumber yield and nitrogen metabolism in response to nitrogen supply. *Scientia Horticulturae*. 82: 309-316.
- SÁNCHEZ, E.; RIVERO, R. M.; RUIZ, J. M.; ROMERO, L. 2004. Changes in biomass, enzymatic activity and protein concentration in roots and leaves of green bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Strike) under high NH_4NO_3 application rates. *Scientia Horticulturae*. 99: 237-248.
- SAS. 1987. SAS/STAT Guide for personal computers. Version 6; statistical analysis system institute, Inc.: Cary, NC. pp. 1028-1056.
- SINGH, S. P. 1999. Production and utilization. In: Sing, S P (ed), Common Bean Improvement in the Twenty-First Century. *Developments in Plant Breeding*. Vol 7. Kluwer Acad., Dordrecht. The Netherlands. pp. 1-24.

- SIVASANKAR, S.; OAKS, A. 1996. Nitrate assimilation in higher plants: the effect of metabolites and light. *Plant Physiology and Biochemistry*. 34:609-620.
- 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. 2004 Interactions between selenium and sulphur nutrition in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 55: 404: 1927-1937.
- WOLF, B. 1982. A comprehensive systems of leaf analysis and its use for diagnosing crop nutrients status. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 13: 1035-1059.
- ZAYED, A.; LYTLE, C. M.; TERRY, N. 1998. Accumulation and volatilization of different chemical species of selenium by plants. *Planta*. 206: 248-92.

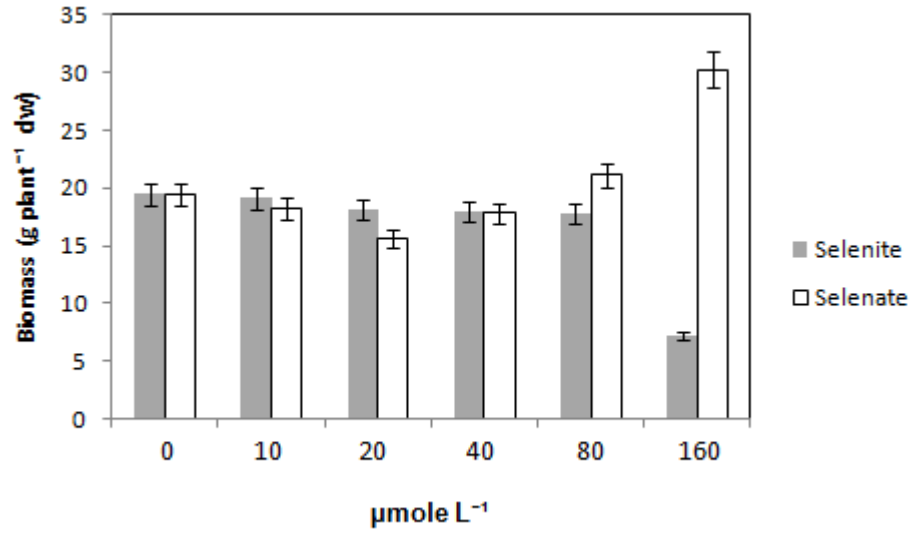


FIGURE 1. Effect of Se treatments on the production of leaf biomass (grams of dry weight) of green bean plants. Data are mean \pm standard error (n=4).

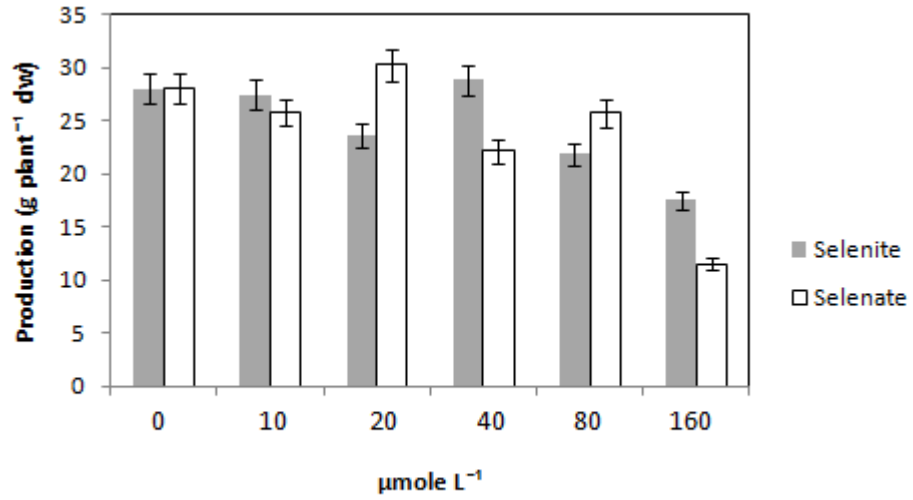


FIGURE 2. Effect of Se treatments on the production of fruits (grams of dry weight) of green bean plants. Data are mean \pm standard error (n=4).

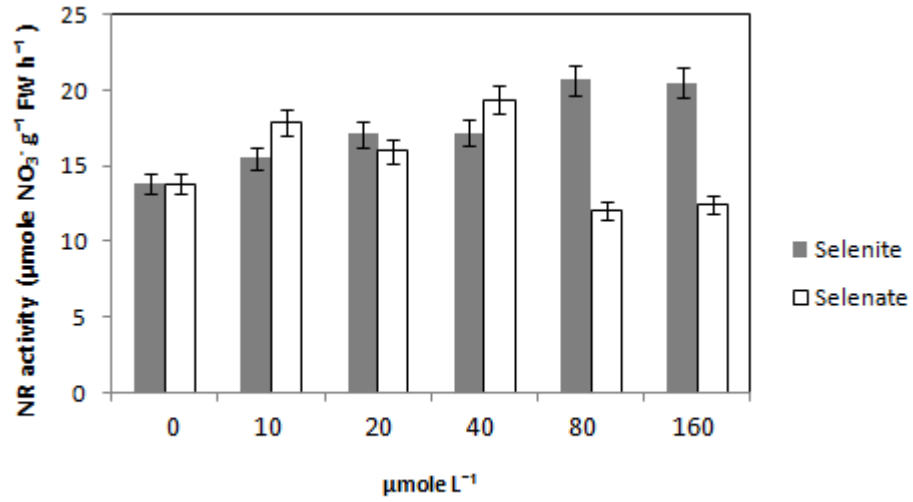


FIGURE 3. Activity of the enzyme Nitrate Reductase in bean leaves (expressed in $\mu\text{mole NO}_3^- \text{g}^{-1} \text{FW h}^{-1}$) in response to different doses of selenate and selenite. Data are means \pm standard error (n=4).

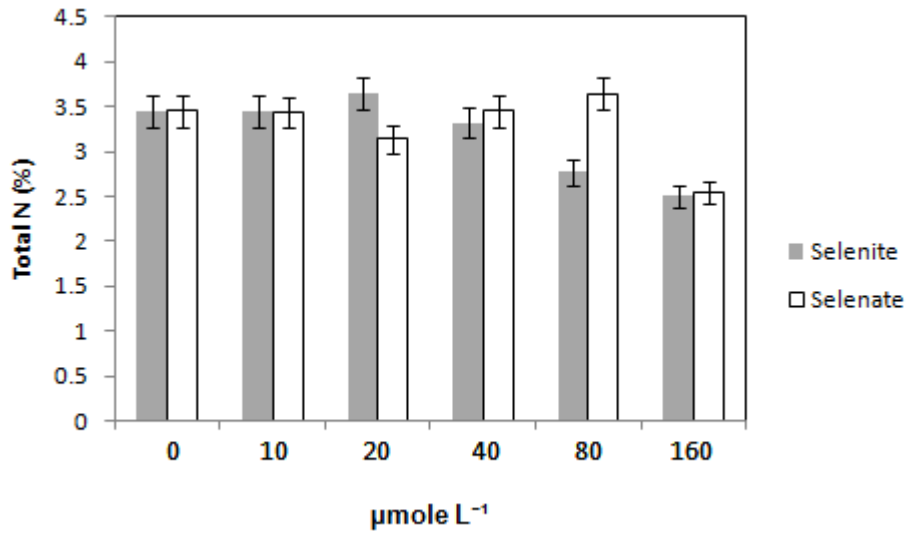


FIGURE 4. Concentration of total Nitrogen in leaf of green bean (expressed as a percentage of dry weight) en respuesta a diferentes dosis de selenato y selenito. Los datos son medias \pm error estándar (n=4).

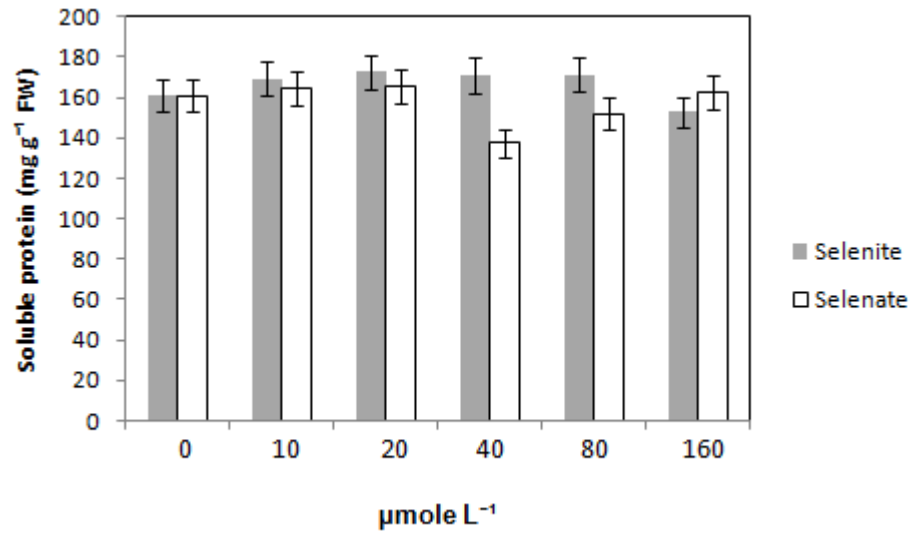


FIGURE 5. Concentration of soluble protein in leaves of green bean (expressed in mg g^{-1} fresh weight) in response to different doses of selenate and selenite. Data are mean \pm standard error (n=4).

CAPITULO IV

Impacto de la fertilización con selenio en la actividad de enzimas detoxificadoras de H₂O₂ en plantas de frijol

M.A. Hermosillo¹, E. Sánchez^{1*}, G.D. Ávila¹, A.M. Mendoza² & R.R. Balandrán².

¹ *Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Coordinación Delicias, Av. 4^a Sur 3820, Fraccionamiento Vencedores del Desierto, Cd. Delicias, Chihuahua, C. P. 33089, México.* ² *Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal, Km. 0.6 Carretera a la Victoria, Cd. Hermosillo, Sonora, C. P. 83304, México.*

Correspondencia

E. Sánchez

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Coordinación Delicias, Av. 4^a Sur 3820, Fraccionamiento Vencedores del Desierto, Cd. Delicias, Chihuahua, C. P. 33089, México.

e-mail: esteban@ciad.mx

Artículo en preparación para su posible envío a: *Annals of Applied Biology*

Resumen

El selenio (Se) es un elemento esencial para muchos organismos, sin embargo, en altas concentraciones puede llegar a ser tóxico, llevando a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). En este estudio las plantas de frijol recibieron diferentes dosis de aplicación de Se (0, 10, 20, 40, 80 y 160 μM) en forma de selenito y selenato, con el objetivo de evaluar la actividad de las enzimas detoxificadoras de H_2O_2 . Los resultados obtenidos indican que la actividad de las enzimas detoxificadoras de H_2O_2 en plantas de frijol es dependiente de la forma química de aplicación de Se, ya que el selenito desde la dosis de 20 μM disminuyó la biomasa y el rendimiento, además incrementó la actividad de la superóxido dismutasa (SOD), y aún cuando incrementó también la actividad de la catalasa (CAT), parece que no es eficiente en la detoxificación de H_2O_2 en presencia de Se, dado el aumento también en la producción de H_2O_2 . Por otra parte, el selenato disminuyó el rendimiento hasta la dosis de 160 μM e incrementó la actividad de la enzima GSH-Px llegando a su máxima actividad en 160 μM , por lo que resultó menos tóxico que el selenito.

Palabras clave: SOD, GSH-Px, CAT, selenito, selenato, peróxido de hidrógeno, *Phaseolus vulgaris L.*

Introducción

El selenio (Se) es considerado un micronutriente esencial para la salud humana (Terry *et al.*, 2000; Zeng y Combs, 2008). Sin embargo, este elemento aún no ha sido considerado esencial para las plantas (Terry *et al.*, 2000), aun cuando existen estudios que demuestran los beneficios del Se en su metabolismo, como en la eliminación de los radicales libres (RL). Los RL y otros radicales de oxígeno son compuestos altamente oxidantes para la célula y son subproductos de reacciones biológicas redox. Para su defensa las plantas cuentan con un sistema antioxidante el cual involucra diferentes enzimas (Arora *et al.*, 2002) en las que destaca la glutatión peroxidasa (GSH-Px) (Lu y Holmgren, 2009) la cual es dependiente del Se para su actividad. Además existen otros componentes no enzimáticos que también participan, como el glutatión (GSH), que está implicado en el control, tanto de forma directa como indirecta, de las concentraciones de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Foyer y Noctor, 2005). Estudios recientes en plantas de lechuga demuestran que la actividad de la enzima GSH-Px depende exclusivamente del contenido de Se (Rios *et al.*, 2008), por lo que la deficiencia de Se está relacionada con la baja actividad de la enzima. Además, estos autores indican que el Se en plantas de lechuga es eficiente para la detoxificación de H_2O_2 , encontrando que hubo una mayor actividad de enzimas detoxificadoras como la ascorbato peroxidasa (APX). Estudios en trigo indican que el Se incrementa la actividad de enzimas como la catalasa (CAT) y peroxidasa (POD) a dosis bajas (0.05 mM Kg^{-1}), sin embargo, al incrementar la dosis (0.15 mM Kg^{-1}) la actividad se redujo (Nowak *et al.*, 2004).

A pesar de que se sabe del beneficio del Se en el metabolismo de las plantas pocos son los trabajos que han evaluado el efecto de las dos formas inorgánicas disponibles

(selenato y selenito) en un mismo cultivo. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue conocer si el Se suministrado como selenito o selenato de sodio tiene un efecto positivo sobre las enzimas óxido-reductoras en la planta de frijol.

Materiales y Métodos

Manejo del cultivo y diseño experimental

Las semillas de *Phaseolus vulgaris* L., cv. Strike se germinaron y crecieron en una mezcla de sustrato (turba, vermiculita y perlita en proporción 3:1:1) en macetas de plástico, de 30 cm de diámetro, en un invernadero experimental ubicado en Delicias, Chihuahua, México, a una temperatura media dentro del invernadero de 25 ± 4 °C. Durante todo el ciclo del cultivo las plantas recibieron una solución nutritiva compuesta por: 6 mM de NH_4NO_3 , 1.6 mM de K_2HPO_4 , 2.4 mM de K_2SO_4 , 4.0 mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.4 mM de MgSO_4 , 5 μM de Fe-EDDHA, 2 μM de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.0 μM de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.25 μM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.3 μM de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y 0.5 μM de H_3BO_3 preparada con agua destilada (Sánchez *et al.*, 2004). El pH de la solución nutritiva osciló entre 5.5 y 6.0.

Las fuentes de Se empleadas fueron selenito y selenato de sodio (Na_2SeO_3 y Na_2SeO_4), las concentraciones de 0, 10, 20, 40, 80 y 160 μM , fueron adicionadas a la solución nutritiva a los 20 días después de la siembra y durante 40 días. El diseño experimental fue completamente al azar con cinco tratamientos de selenito y cinco de selenato, con cuatro repeticiones por tratamiento y un control sin la aplicación de Se.

Muestreo vegetal

Las plantas fueron muestreadas a los 60 días después de la germinación, cuando estaban en la etapa fenológica de desarrollo completo y madurez del fruto. Se separaron los diferentes órganos de la planta de frijol (hoja, raíz, tallo, pecíolo, semilla y vaina), se lavaron tres veces con agua de la llave y una vez con agua desionizada.

Una parte del material vegetal se utilizó para los ensayos de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), contenido de glutatión total y actividad enzimática (material vegetal fresco de semilla). El resto del material fue liofilizado y se utilizó para determinar la concentración de Se en la semilla, biomasa total y rendimiento (material vegetal seco).

Biomasa y rendimiento

La biomasa se determinó con el promedio de peso seco de toda la planta.

El rendimiento se expresó como el peso medio del fruto por planta en gramos de peso seco (g.p.s.). Los frutos del frijol fueron pesados en el muestreo de cada planta.

Concentración de H_2O_2

El contenido de H_2O_2 fue medido colorimétricamente con la metodología descrita por Mukherjee y Choudhuri (1983). Se hizo la extracción macerando 1 g de semilla en 10 mL de acetona fría. Se centrifugó a 3,500 rpm por 5 min. Una alícuota de 1 mL del extracto fue mezclada con 200 μ L de $TiCl_4$ al 20% disuelto en HCl 2 M, y 1 mL de NH_4OH . Posteriormente se agitaron los tubos y se centrifugaron a 3,500 rpm por 5 min. Se desechó el sobrenadante y se hicieron tres lavados al sedimento con acetona fría. Se añadieron 4 mL de H_2SO_4 2 M y se incubó por 15 minutos. Posteriormente se agregaron

3 mL de H₂O, se filtró y se midió por espectrofotometría a una longitud de onda de 415 nm frente a una curva patrón de H₂O₂.

Contenido de Se total

Para la determinación del Se, 25 mg de la muestra se digirieron con 2.5 mL de HNO₃ concentrado y 1 mL de H₂O₂ en un horno de microondas. La solución resultante fue diluida en 25 mL de agua desionizada y la concentración de Se fue determinada por Espectrometría de Masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS) de acuerdo a Pedrero *et al.* (2006).

Actividad de las enzimas detoxificadoras de H₂O₂

La actividad de la GSH-Px (EC 1.11.1.9) fue medida mediante el método de Flohé y Günzler (1984), usando H₂O₂ como sustrato. El extracto enzimático se obtuvo mediante la maceración de 0.5 g de material vegetal fresco en 5 mL de buffer KNaHPO₄, pH 7.0 y tras una centrifugación a 3,000 rpm por 10 min. Para la reacción enzimática 0.2 mL de sobrenadante fueron adicionados dentro de los tubos de ensayo y mezclados con 0.4 mL de GSH 0.1 mM y 0.2 mL de KNaHPO₄, 0.067 M. El tubo control se trató de la misma manera, sustituyendo el extracto enzimático por buffer de maceración. Después de un precalentamiento en un baño a 25 °C durante 5 min se adicionaron 0.2 mL de H₂O₂ 1.3 mM, iniciándose así la reacción. Transcurridos 10 min a temperatura ambiente, se detuvo la reacción mediante la adición de 1 mL de ácido tricloroacético al 1% (v/v), y la mezcla se introdujo en un baño de hielo durante 30 min se centrifugó por 10 min a 3,000 rpm. Del sobrenadante obtenido se tomaron 0.48 mL y se mezclaron con 2.2 mL

de 0.32 M Na_2HPO_4 y 0.32 mL de 1 mM DNTB. La absorbancia fue medida a 412 nm por espectrofotometría en un tiempo máximo de 5 min.

La actividad de la enzima CAT (EC 1.11.1.6) se determinó por el método descrito por Rao *et al.* (1997). Se maceraron 0.5 g de material vegetal fresco en 5 mL de buffer Hepes-HCl 25 mM pH 7.8 con PVPP al 10%; posteriormente se centrifugó a 11500 rpm durante 20 min. Posteriormente, se mezcló en tubos de ensayo: 0.75 mL de buffer $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 25 mM pH 7, 0.75 mL de EDTA- Na_2 0.8 mM, 1 mL de H_2O_2 y 0.5 mL de extracto enzimático. Se midió el cambio de absorbancia a una longitud de onda de 240 nm durante 3 min.

La actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) (EC 1.15.1.1) se realizó siguiendo el método de Giannopolitis y Ries (1977) y Beyer y Fridovich (1987). Se maceraron 0.5 g de material fresco en 5 mL de buffer Hepes-HCl 50 mM pH 7.6; posteriormente se centrifugó a 11,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante obtenido se diluyó en una proporción 1:5 con el buffer de maceración. Posteriormente se trabajó con: blanco, control y muestras. El blanco se preparó mediante la adición de 5 mL de buffer de reacción consistente en: buffer $\text{CO}_3\text{Na}_2\text{-CO}_3\text{HNa}$ 50 mM pH 10.2, EDTA- Na 0.1 mM, L-metionina 12 mM, NTB 0.075 mM y riboflavina 0.002 mM. Además al tubo se le adicionó 0.1 mL de buffer de maceración. Se preparó un tubo control por cada muestra conteniendo 0.1 mL de extracto enzimático y 5 mL de buffer de reacción. En los tubos de las muestras se colocaron 0.1 mL de extracto enzimático y 5 mL de buffer de reacción. Todos los tubos se agitaron y se guardaron en oscuridad. A continuación se procedió a la lectura a una longitud de onda de 560 nm. Posteriormente el blanco y las muestras fueron iluminadas durante 15 min, con una intensidad lumínica de 380 μmol

$\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Transcurridos 15 min, se midieron de nuevo todas las muestras por espectrofotometría a 560 nm, primero los blancos, luego el control y por último las muestras.

Concentración del glutatión total

Se determinó siguiendo el método de Gossett *et al.* (1994). Se hizo la extracción macerando 1 g de material vegetal fresco en 5 mL de ácido metafosfórico al 5% (v/v). Se centrifugó a 13,500 rpm durante 15 min, se agregaron 50 μL del extracto, 250 μL de buffer Heppes-HCl 50 mM pH 7.6; que contenía 330 mM de betaína; y por último 150 μL de ácido sulfosalicílico al 10% (p/v). Después en un tubo de ensayo se adicionaron 150 μL de la mezcla anterior, 700 μL de NADPH 0.3 mM, 0.1 mL de 5,5'-dithiobis-(2-ácido nitrobenzoico) (DNTB) 6 mM y 50 μL de glutatión reducido (10 U mL^{-1}). La lectura de las muestras se hizo a 412 nm, frente a una curva estándar de glutatión disuelto en ácido metafosfórico al 5%.

Análisis estadístico

Todos los datos fueron sometidos a análisis de varianza. Para la diferencia entre las medias de los tratamientos se utilizó la prueba de LSD a 95 % (SAS, 1987).

Resultados

La biomasa y el rendimiento de un cultivo son parámetros fiables para definir el índice de tolerancia al estrés (Melchor *et al.*, 2005). El Se tiene efectos positivos sobre el crecimiento y la tolerancia al estrés de las plantas, sin embargo, según la dosis y forma

inorgánica aplicada (selenato o selenito) también puede ser tóxico (Djanaguiraman *et al.*, 2005; Ríos *et al.*, 2009). Los resultados de biomasa total presentaron diferencias significativas solo al aplicar selenito, con la mayor disminución en la dosis de 160 μM (Tabla 1), presentándose un decremento del 45.7% con respecto al control. Respecto al rendimiento, las dosis que favorecieron su aumento fueron 40 μM de selenito y 20 μM de selenato (Tabla 1), con un incremento del 2.8% y 8.0%, respectivamente en relación al control.

El peróxido de hidrógeno es producto de la reducción de O_2 . Es potencialmente oxígeno reactivo, pero no es un radical libre. Sin embargo, cuando este compuesto se encuentra en grandes cantidades puede causar daño a las células de las plantas originando estrés oxidativo. La mayor concentración de peróxido de hidrógeno se presentó en la dosis de 160 μM de selenito, con un aumento del 68% en relación al control.

Como ya se mencionó anteriormente el Se no es un nutriente esencial para las plantas, a pesar de esto puede ser absorbido y acumulado en los tejidos. Para la semilla del frijol, dicha acumulación se vió favorecida al aplicar selenito (Figura 1), presentando la mayor acumulación en la dosis de 160 μmol , lo que podría ser benéfico para la producción de compuestos orgánicos de Se.

Las plantas cuentan con un eficiente sistema de eliminación de especies reactivas de oxígeno para la protección contra reacciones oxidativas, en dicho sistema se encuentran las enzimas detoxificadoras, entre las cuales destacan la GSH-Px, CAT y SOD (Kong *et al.*, 2005), además de compuestos como el glutation. La actividad GSH-Px presentó los

mayores incrementos en la forma de selenato, destacando en la dosis de 10 μmol , mientras que al aplicar selenito su actividad se vió disminuida al aumentar la dosis (Figura 2).

La mayor actividad de la enzima CAT, se presentó en las plantas tratadas con selenito a dosis de 160 μM (Figura 3).

La SOD es la enzima encargada de la producción de H_2O_2 (Bowler *et al.*, 1994). La mayor actividad de la SOD al aplicar selenato, se presentó en la dosis de 10 μmol , lo que coincide con el estudio de Aggarwal *et al.* (2011) en frijol. Sin embargo, al aplicar selenito, la actividad de la SOD aumentó, alcanzando el máximo valor en la dosis de 160 μM , superando al testigo con un 100% de su actividad.

El GSH actúa como un componente del ciclo ascorbato-glutation que participa en la eliminación del exceso de H_2O_2 (Noctor y Foyer, 1998) en una reacción en la que el glutatión se oxida. Respecto al GSH total, los resultados indicaron que el Se en forma de selenito en dosis de 20 μM presentó la mayor acumulación de este compuesto antioxidante, esto es muy importante también ya que una de las formas en las que el glutatión degrada H_2O_2 , es mediante una reacción catalizada por la enzima glutatión peroxidasa (Szalai *et al.*, 2009).

Discusión

La drástica disminución de la biomasa total al aplicar el Se se atribuye al efecto tóxico del Se, al actuar como prooxidante a dosis altas, ya que provocó muerte celular en el

tejido, apareciendo cuando el nivel de daño oxidativo supera a la capacidad del sistema de defensa antioxidante (Yan y Spallholz, 1993).

El aumento en la concentración de peróxido de hidrógeno (Tabla 1), a medida que se aumenta la dosis de Se en forma de selenito, coincide con una disminución del rendimiento del cultivo, debido al efecto fitotóxico de esta forma de Se a altas concentraciones. La influencia del Se sobre la biomasa de los cultivos está relacionada con la capacidad que tenga la planta para tolerar diferentes cantidades y fuentes de Se sin llegar a ser fitotóxicas.

La alta concentración de Se encontrada en las plantas resulto tóxica, debido a tres mecanismos principales según Spallholz y Hoffman (2002); la generación de radicales superóxido, la sustitución de Se por el azufre en la síntesis de proteínas y la inhibición de la metilación de compuestos orgánicos de Se. Las dosis que favorecieron el rendimiento (40 μM de selenito y 20 μM de selenato) presentaron altas concentraciones de Se (138 y 51 mg kg^{-1} p.s. respectivamente) (Figura 1) lo que indica el alto contenido de Se que soporta la planta sin presentar síntomas de toxicidad. La mayoría de las plantas cultivadas soportan alrededor de 25 mg kg^{-1} de Se (Hasanuzzaman *et al.*, 2010). La lechuga tolera un máximo de 30 mg kg^{-1} de Se sin mostrar toxicidad (Ríos *et al.*, 2009). El frijol contiene gran cantidad de proteína en el fruto (Broughton *et al.*, 2003), quizá esto le favorece para tolerar altas concentraciones de Se sin presentar síntomas de toxicidad. Ya que las plantas transforman las formas inorgánicas de Se en compuestos orgánicos de Se mediante la adición de este nutriente en forma no específica a las proteínas (Terry *et al.*, 2000).

Los resultados en la actividad de la enzima GSH-Px permiten puntualizar la dependencia de la actividad de la enzima con la forma química y la dosis de Se en este cultivo. En plantas como el zacate ryegrass y lechuga la mayor actividad de la enzima se observó al aplicar selenato y selenito a dosis de 120 μM (Cartes *et al.*, 2005; Ríos *et al.*, 2009) lo que lo relaciona a una dependencia más con la forma que con la dosis. La menor actividad de esta enzima a altas dosis de selenito en nuestros resultados, coincide con la menor cantidad de biomasa total, menor producción, mayor acumulación de selenio y máxima concentración de H_2O_2 . Todo esto confirma la toxicidad del Se a dosis altas para este cultivo, debido quizá principalmente a la generación de radicales superóxido, como se mencionó anteriormente.

Los resultados encontrados en la enzima CAT, indican que a pesar de que el selenito incrementó su actividad, no es una enzima eficiente en la detoxificación de H_2O_2 bajo esta forma de aplicación, ya que se presentó también la mayor concentración de este compuesto. Otros reportes indican que en plantas como lechuga el Se no tiene influencia sobre la actividad de esta enzima (Ríos *et al.*, 2009). Sin embargo, en plantas de frijol con crecimiento de 10 días, el selenato a dosis de 20 μM incrementa la actividad de esta enzima, pero a dosis de 60 μM la disminuye (Aggarwal *et al.*, 2011). Estas diferencias son debido a que el metabolismo del Se en las plantas difiere de acuerdo a la especie, etapa de crecimiento y órgano de la planta (Hasanuzzaman *et al.*, 2010). Lo que indica la importancia de conocer a detalle la influencia del Se en cada cultivo.

Los resultados de la actividad de la enzima SOD, muestra un alto estrés oxidativo de la planta al aplicar selenito, lo que coincide con la menor biomasa total y la mayor producción de H_2O_2 (Figura 4) siendo similar a los resultados de Dajanaguiraman *et al.*

(2005) en soya que reportan una mayor actividad de la SOD al aplicar selenito a dosis consideradas fitotóxicas.

La mayor acumulación del GSH al aplicar selenito a dosis de 20 μM , podría explicar por qué a altas dosis de Se en forma de selenato presentó menor producción de fruto, debido a la menor cantidad de este compuesto antioxidante. Además, las altas concentraciones de Se en forma de selenito no disminuyeron el contenido de glutathione con relación al testigo, del mismo modo disminuyó menos el rendimiento. Estudios recientes han demostrado que el Se no solo puede promover el crecimiento y desarrollo de las plantas, sino que incrementa su resistencia a diversos tipos de estrés, ya que incrementa su capacidad antioxidante y al incrementar el contenido de compuestos como el glutathione (Peng *et al.*, 2002; Djanaguiraman *et al.*, 2005; Rios *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos indican que la actividad de las enzimas detoxificadoras de H_2O_2 en plantas de frijol cv. Strike es dependiente de la forma química de aplicación de Se. El selenito desde la dosis de 20 μM disminuyó la biomasa y el rendimiento, además incrementó la actividad de la SOD. Además, estas dosis incrementaron la actividad de la CAT, sin embargo, parece que no es eficiente en la detoxificación de H_2O_2 en presencia de Se, dado el aumento también en la producción de H_2O_2 . Mientras que el selenato disminuyó el rendimiento hasta la dosis de 160 μmol e incremento la actividad de la enzima GSH-Px llegando a su máxima actividad en 160 μmol . Por lo que resultó menos tóxico que el selenito.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto de Ciencia Básica de CONACYT con clave 081055. Además, agradecemos al CONACYT por la beca otorgada a Martha Aracely Hermosillo Cereceres para realizar estudios de Doctorado dentro del Posgrado del CIAD.

Bibliografia

- Aggarwal, M., Sharma S., Kaur N., Pathania D., Bhandhari K., Kaushal N., Kaur R., Singh K., Srivastava A., Nayyar H. (2011). Exogenous proline application reduces phytotoxic effects of selenium by minimising oxidative stress and improves growth in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Biological Trace Element Research*, **140**, 354-367.
- Arora, A., Sairam, R.K., Srivastava, G.C. (2002). Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science*, **82**, 1227-1238.
- Beyer, W.F., Fridovich, I. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical Biochemistry*, **161**, 559-566.
- Bowler, C., Van, C. W., Van, M. M., Inzé, D. (1994). Superoxide dismutase in plants. *Critical Review in Plant Science*. **13**, 199-218.
- Broughton, W. J., Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P., Vanderleyden, J. (2003). Beans (*Phaseolus* spp.) model food legumes. *Plant and Soil*, **252**, 55-128.
- Cartes, P., Gianfreda, L., Mora, M.L. (2005). Uptake of selenium and its antioxidant activity in ryegrass when applied as selenate and selenite forms. *Plant and Soil*, **276**, 359-367.
- Djanaguiraman, M., Devi, D.D., Shanker, A.K., Sheeba, J.A., Bangrusamy, U. (2005). Selenium an antioxidative protectant in soybean during senescence. *Plant and Soil*, **272**, 77-86.
- Flohé, L., Günzler, W.A. (1984). Assays of glutathione peroxidase. In *Methods in Enzymology*. Vol. 105. Pp. 114-121. Ed. L. Packer. New York: Academic Press.
- Foyer, C.H., Noctor, G. (2005). Redox homeostasis and antioxidant signalling: a metabolic link between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell*, **17**, 1866-1875.
- Giannopolitis, C.N., Ries, S.K. (1977). Superoxide dismutases. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, **59**, 309-314.
- Gosset, D.R., Millhollon, E.P., Lucas, M.C. (1994). Antioxidant response to NaCl stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of cotton. *Crop Science*, **34**, 706-714.

- Hasanuzzaman, M., Hossain, M.A., Fujita, M. (2010). Selenium in higher plants: physiological role, antioxidant metabolism and abiotic stress tolerance. *Journal of Plant Science*, **5**, 354-375.
- Kong, L.G., Wang, M., Bi, D. (2005). Selenium modulates the activities of antioxidant enzymes, osmotic homeostasis and promotes the growth of sorrel seed lings under salt stress. *Plant Growth Regulation*, **45**, 155-163.
- Lu, J., Holmgren, A. (2009). Selenoproteins. *The Journal of Biological Chemistry*, **284**, 723-727.
- Melchor, J., Rivero, R.M., Romero, L., Ruiz, J.M. (2005). Evaluation of some nutritional and biochemical indicators in selecting salt-resistant tomato cultivars. *Environmental and Experimental Botany*, **54**, 193-20.
- Mukherjee, S.P., Choundhuri, M.A. (1983). Implications of water stress-induced changes in the levels of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in *Vigna* seedlings. *Physiologia Plantarum*, **58**, 166-170.
- Noctor, G., Foyer, C.H. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **49**, 249-279.
- Nowak, J., Kaklewski, K., Ligocki, M. (2004). Influence of selenium on oxidoreductive enzymes activity in soil and in plants. *Soil Biology & Biochemistry*, **36**, 1553-1558.
- Pedrero, Z., Madrid, Y., Cámara, C. (2006). Selenium species bioaccessibility in enriched radish (*Raphanus sativus*): A potential dietary source of selenium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 2412-2417.
- Peng, X. L., Liu, Y.Y., Luo, S.G. (2002). Effects of selenium on lipid peroxidation on lipid peroxidation and oxidizing ability of rice roots under ferrous stress. *Journal of Northeast Agricultural University*, **19**, 9-15.
- Rao, M.V., Paliyath, C., Ormrod, D.P., Murr, D.P., Watkins, C.B. (1997). Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress and H₂O₂ metabolizing enzymes: salicylic acid mediated oxidative damage requires H₂O₂. *Plant Physiology*, **115**, 137-149.
- Ríos, J.J., Rosales, M.A, Blasco, B., Cervilla, L.M., Romero, L., Ruiz, J.M. (2008). Biofortification of Se and induction of the antioxidant capacity in lettuce plants. *Scientia Horticulturae*, **116**, 248-255.

- Ríos, J.J., Blasco, B., Cervilla, L.M., Rosales, M.A., Sanchez, R. E., Romero, L., Ruiz, J.M. (2009). Production and detoxification of H₂O₂ in lettuce plants exposed to selenium. *Annals of Applied Biology*, **154**, 107-116.
- Sánchez, E., Rivero, R.M., Ruiz, J.M., Romero, L. (2004). Changes in biomass, enzymatic activity and protein concentration in roots and leaves of green bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Strike) under high NH₄NO₃ application rates. *Scientia Horticulturae*, **99**, 237-248.
- SAS (1987). SAS/STAT Guide for personal computers. Version 6; Statistical Analysis System Institute, Inc. Cary, North Carolina p. 1028-1056.
- Spallholz, J., Hoffman, D. (2002). Selenium toxicity: cause and effects in aquatic birds. *Aquatic Toxicology*, **57**, 27-37.
- Szalai, G., Kellos, T., Galiba, G., Kocsy, G. (2009). Glutathione as an Antioxidant and Regulatory Molecule in Plants Under Abiotic Stress Conditions. *Journal of Plant Growth Regulation*, **28**, 66-80.
- Terry, N., Zayed, A.M., De Souza, M.P., Tarun, A.S. (2000). Selenium in higher plants. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **51**, 401-432.
- Yan, L., Spallholz, J.E. (1993). Generation of reactive oxygen species from the reaction of selenium compounds with thiols and mammary tumor cells. *Biochem Pharmacol*, **45**, 429-437.
- Zeng, H.G., Combs, F. (2008). Selenium as an anticancer nutrient: roles in cell proliferation and tumor cell invasion. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **19**, 1-7.

Tabla 1 Biomasa, rendimiento y concentración de H₂O₂ en plantas de frijol cv. Strike expuestas a diferentes dosis y formas de selenio (selenato y selenito).

Dosis Se (μ M)	Biomasa total (g p.s.)		Rendimiento (g p.s.)		Concentración de H ₂ O ₂ (μ mol g ⁻¹ p.f.)	
	Selenato	Selenito	Selenato	Selenito	Selenato	Selenito
0	73.65 a	73.65 a	28.02 a	28.02 ab	4.27 c	4.27 b
10	68.72 a	73.11 a	25.83 a	27.47 ab	6.14 ab	4.38 b
20	71.37 a	66.43 b	30.28 a	23.59 bc	6.23 a	5.07 ab
40	62.62 a	69.24 ab	22.14 a	28.82 a	5.61 ab	5.64 ab
80	72.41 a	58.20 c	25.76 a	21.84 cd	5.36 b	5.78 ab
160	73.66 a	39.98 d	11.47 b	17.56 d	3.49 d	7.18 a
Significancia	ns	*	*	*	*	*

Medias con letras iguales en una columna no fueron significativamente diferentes (LSD, 0.05). p.s. (peso seco) y p.f. (peso fresco). Los niveles de significancia están dados por *P \leq 0.05.

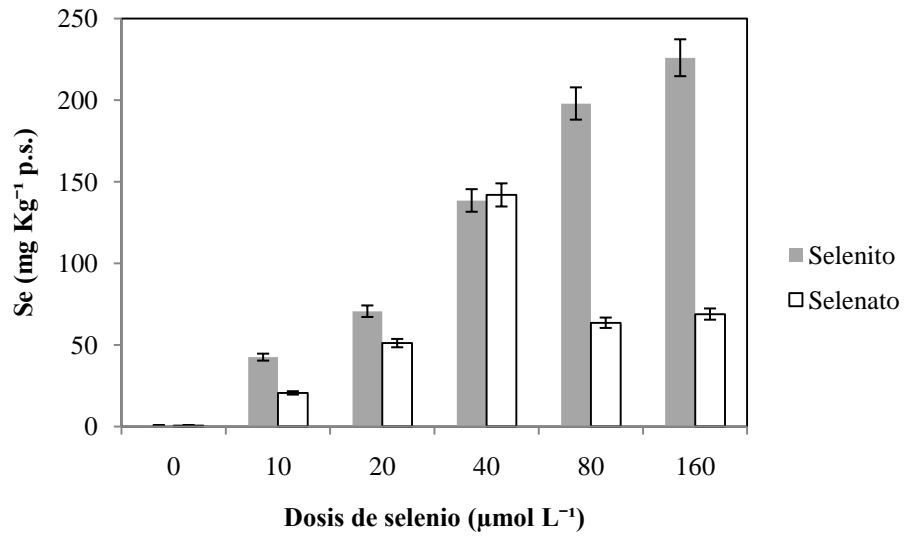


Figura 1 Concentración de Se en la semilla de frijol cv. Strike bajo diferentes dosis y formas de Se. Los datos son medias \pm error estándar (n=4).

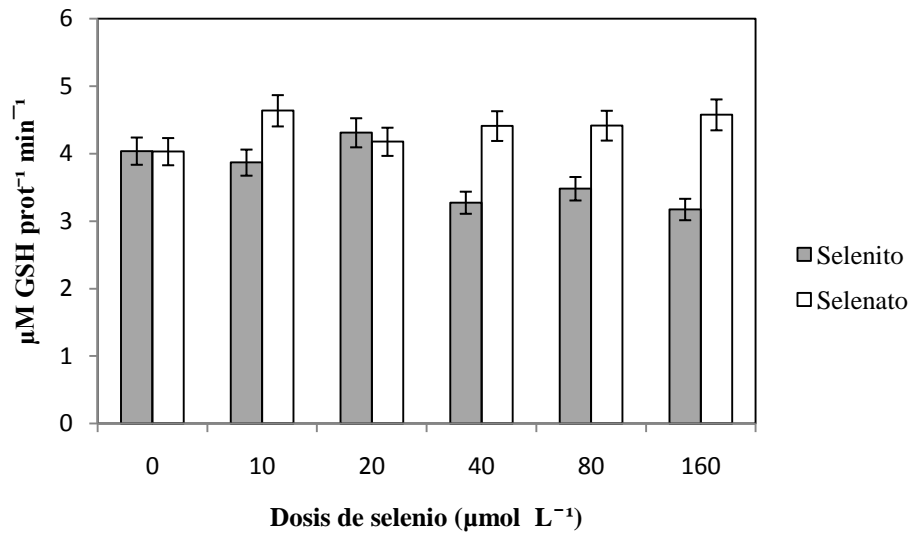


Figura 2 Actividad de la enzima GSH-Px en semillas de frijol cv. Strike bajo diferentes dosis y formas de Se. Los datos son medias \pm error estándar (n=4).

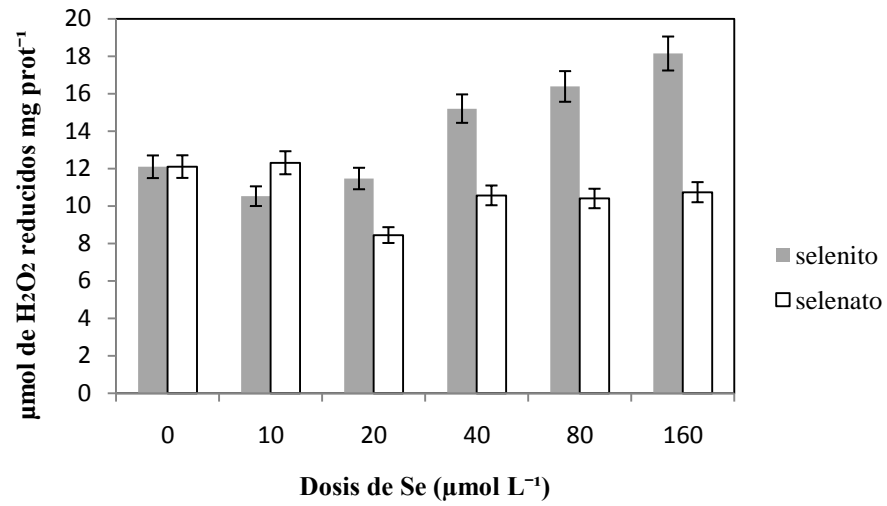


Figura 3 Actividad de la enzima CAT en semillas de frijol cv. Strike bajo diferentes dosis y formas de Se. Los datos son medias \pm error estándar (n=4).

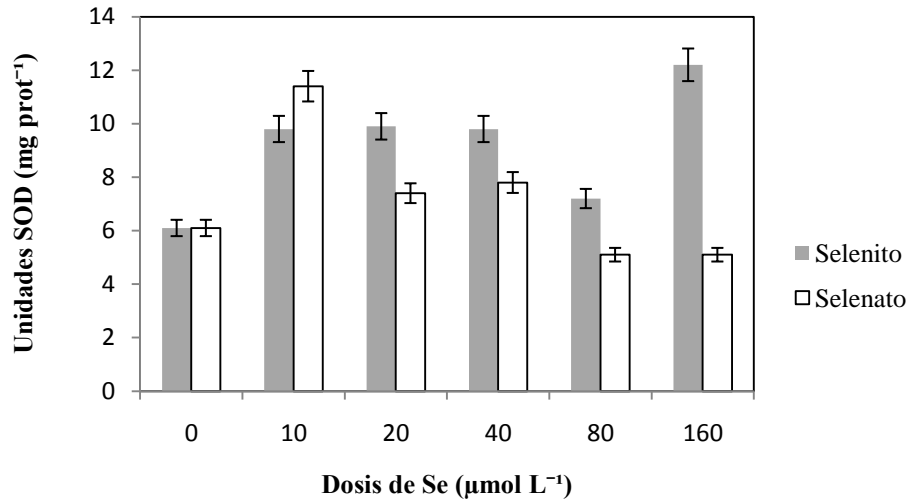


Figura 4 Actividad de la enzima SOD en semillas de frijol cv. Strike bajo diferentes dosis y formas de Se. Los datos son medias \pm error estándar (n=4).

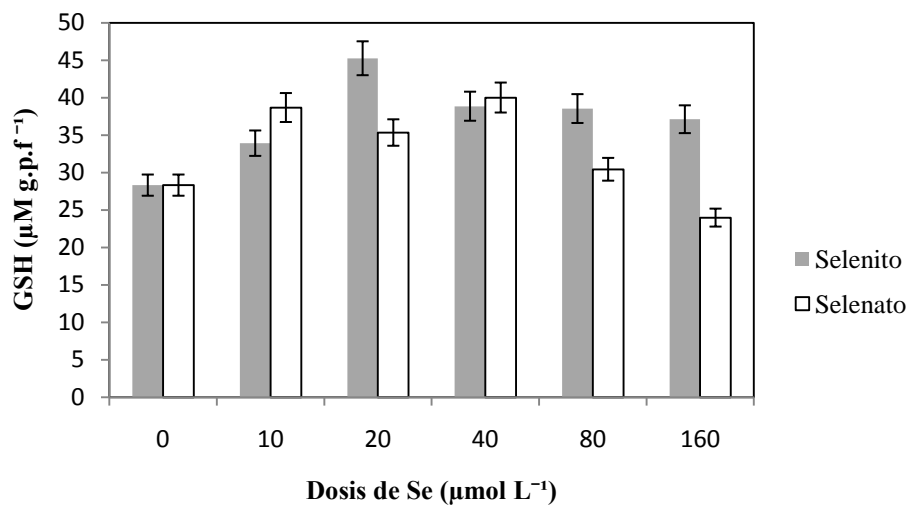


Figura 5 Concentración de GSH en semillas de frijol cv. Strike bajo diferentes dosis y formas de Se. Los datos son medias \pm error estándar (n=4).

CAPITULO V

Biofortificación con selenio y su efecto en la capacidad antioxidante del frijol

Selenium biofortification and its effect on the antioxidant capacity of bean

M.A. Hermosillo-Cereceres^a, E. Sánchez-Chávez^{c*}, G. Ávila-Quezada^a, A.M. Mendoza-Wilson^b and R.R. Balandrán-Quintana^b

^a *Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Coordinación Delicias, Av. 4^a Sur 3820, Fraccionamiento Vencedores del Desierto, Cd. Delicias, Chihuahua, C. P. 33089, México.* ^b *Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal, Km. 0.6 Carretera a la Victoria, Cd. Hermosillo, Sonora, C. P. 83304, México.*

**Corresponding author. E-mail: esteban@ciad.mx*

Artículo en preparación para su posible envío a: **CyTA Journal of Food**

Existe evidencia de los beneficios del selenio (Se) sobre el crecimiento de los cultivos. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la biofortificación con Se en forma de selenito y selenato en la capacidad antioxidante de semillas de frijol. Seis dosis de selenato y selenito de sodio fueron probadas (0, 10, 20, 40, 80 y 160 μM) durante 40 d, adicionado bajo la forma de fertirrigación. Se determinó la biomasa, rendimiento, el contenido de Se en las semillas, contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante bajo dos diferentes métodos. Los resultados encontrados indican que las mejores dosis para biofortificar el frijol fueron 20 μM de selenato y 40 μM de selenito, ya que se encontró un incremento en el rendimiento. Además, el Se incrementó la capacidad antioxidante ya que la dosis de 160 μM de selenito, tuvo un incremento del 33% en relación al control.

Palabras clave: Na_2SeO_4 , Na_2SeO_3 , Strike, Poder reductor, DPPH.

There is evidence of the benefits of selenium (Se) on the growth of crops. The aim of this study was to determine the effect of biofortification with Se in selenite and selenate form in the antioxidant capacity of bean seeds. Six doses of sodium selenite and selenate were tested (0, 10, 20, 40, 80 and 160 μM) for 40 d, added in the form of fertigation. We determined the biomass, yield, the Se content in the seeds, total phenolic content and antioxidant capacity under two different methods. The results indicate that the best dose to biofortify the beans were 20 μM of selenate and 40 μM of selenite, as they found an increase in performance. In addition, the antioxidant capacity was increased as the dose of 160 μM selenite had an increase 33% compared to control.

Key words: Na_2SeO_4 , Na_2SeO_3 , Strike, reducing power, DPPH.

Introducción

El selenio (Se) es considerado un micronutriente esencial para la salud humana (Terry *et al.*, 2000; Zeng y Combs, 2008), ya que las selenoproteínas tienen un papel muy importante en la defensa antioxidante de los humanos, por su importancia en la fertilidad, metabolismo de la hormona tiroidea, así como, en la respuesta inmune (Lu y Holmgren, 2009); además el Se actúa como un agente anticancerígeno bajo una adecuada ingesta (Rayman, 2000). Duffield *et al.* (2002) indican que el consumo de 200 $\mu\text{g día}^{-1}$ de Se reduce la incidencia de cáncer de pulmón y próstata. La recomendación del consumo diario es de 50-70 $\mu\text{g día}^{-1}$ (USDA, 2003). No obstante, un consumo mayor de 400 $\mu\text{g día}^{-1}$ tiene un efecto dañino en la salud (DRI, 2000).

Sin embargo, este elemento aun no ha sido considerado esencial para un óptimo desarrollo de las plantas (Terry *et al.*, 2000), aun cuando existen estudios que demuestran los beneficios del Se en el metabolismo de las mismas bajo diferentes tipos de estrés como: sequía (Yao *et al.*, 2009), salinidad (Hawrylak-Nowak, 2009), bajas temperaturas (Hawrylak-Nowak, 2010), metales pesados (Cartes *et al.*, 2010) y radiación UV (Valkama *et al.*, 2003), ya que el Se incrementa la resistencia de las plantas frente al estrés oxidativo causado por los radicales libres de oxígeno, relacionado con la capacidad antioxidante.

Hay varios reportes que relacionan el consumo de frijol con un menor riesgo de enfermedades cardiovasculares, diabetes, obesidad, cáncer y enfermedades del aparato digestivo (Anderson, 1984; Bazzano *et al.*, 2001). Estos beneficios en la salud se han relacionado con la presencia de metabolitos secundarios como los compuestos fenólicos que poseen propiedades antioxidantes (Lazze *et al.*, 2003). La biofortificación con Se en

el cultivo de frijol puede proporcionar los beneficios del Se a la salud humana. Por los beneficios del Se a la salud humana, se ha estudiado el efecto del mismo sobre los cultivos en programas de biofortificación, con excelentes resultados en cuanto a la acumulación en plantas de diferentes especies (Ríos *et al.*, 2008, Yadav *et al.*, 2007, Li *et al.*, 2008, Duksay *et al.*, 2009). Sin embargo, existe escasa información en el cultivo del frijol bajo el concepto de biofortificación con Se.

El contenido de Se en las plantas depende directamente del nivel de este elemento en el suelo (Lin, 2005). La tolerancia de los cultivos al Se varía según la especie (Hartikainen *et al.*, 2000; Lyons *et al.*, 2005; Rani *et al.*, 2005). Actualmente, existe una gran deficiencia de este micronutriente. La deficiencia de Se es provocada por la baja disponibilidad de este elemento en la mayoría de los suelos, ya que la mayor parte del Se en cualquier sistema de producción de alimentos reside del suelo (Combs, 2001).

Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue biofortificar al frijol con Se para conocer si este elemento suministrado como selenito y selenato de sodio tiene un efecto positivo sobre la capacidad antioxidante del frijol.

Materiales y métodos

Manejo del cultivo y diseño experimental

Las semillas de *Phaseolus vulgaris* L., cv. Strike se germinaron y crecieron en una mezcla de sustrato (turba, vermiculita y perlita en proporción 3:1:1) en macetas de plástico, de 30 cm de diámetro, en un invernadero experimental ubicado en Delicias, Chihuahua, México, a una temperatura media dentro del invernadero de 25 ± 4 °C.

Durante todo el ciclo del cultivo las plantas recibieron una solución nutritiva compuesta por: 6 mM de NH_4NO_3 , 1.6 mM de K_2HPO_4 , 2.4 mM de K_2SO_4 , 4.0 mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.4 mM de MgSO_4 , 5 μM de Fe-EDDHA, 2 μM de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1.0 μM de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.25 μM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.3 μM de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y 0.5 μM de H_3BO_3 preparada con agua destilada (Sánchez *et al.*, 2004). El pH de la solución nutritiva osciló entre 5.5 y 6.0.

Las fuentes de Se empleadas fueron selenito (Na_2SeO_3) y selenato de sodio (Na_2SeO_4), las concentraciones de 10, 20, 40, 80 y 160 μM , fueron adicionadas a la solución nutritiva a los 20 días después de la siembra y durante 40 días. El diseño experimental fue completamente al azar con cinco tratamientos de selenito y cinco de selenato, con cuatro repeticiones por tratamiento y un control sin la aplicación de Se.

Muestreo vegetal

Las plantas fueron muestreadas a los 60 días después de la germinación, cuando estaban en la etapa fenológica de desarrollo completo y madurez del fruto. Se separaron los diferentes órganos de la planta de frijol (hoja, raíz, tallo, pecíolo, semilla y vaina), se lavaron tres veces con agua de la llave y una vez con agua desionizada.

Biomasa total y producción

La biomasa se determinó con el promedio de peso seco de toda la planta. El rendimiento se expresó como el peso medio del fruto por planta en gramos de peso seco (g p.s.). Los frutos del frijol fueron pesados en el muestreo de cada planta.

Cuantificación de fenoles totales

El contenido en fenoles totales fue determinado colorimétricamente ante una curva patrón de ácido galico (5, 10,15 20 y 40 mg L⁻¹), propuesta por propone Singlenton *et al.* (1985). Una cantidad de 0.5-1 g de semillas fue homogenizado con 5 mL de metanol, 5 mL de cloroformo y 2.5 mL de una solución de NaCl al 1% (v/v). En el homogenizado, tras una centrifugación a 5,000 rpm durante 10 min, se obtuvieron las siguientes fases: fase metanólica, que contiene ácidos fenólicos, azúcares solubles y compuestos de bajo peso molecular; interfase, formada por proteínas precipitadas por el NaCl; y fase clorofórmica, constituida por lípidos disueltos. La solución metanólica fue la que se utilizó para la cuantificación de los fenoles totales.

A 1.5 ml de Na₂CO₃ al 2% (p/v) se le agregaron 0.5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteau al 50% (v/v), 2.75 ml de H₂O desionizada y 0.5 ml del extracto. Tras una incubación a temperatura ambiente durante 60 min se procedió a la determinación de los fenoles totales frente a una curva patrón de ácido galico (5, 10,15 20 y 40 mg L⁻¹), a una absorbancia de 725 nm. Los resultados de fenoles totales fueron expresados en mg de ácido galico 100 g⁻¹ p.f.

Determinación de la capacidad antioxidante

Método DPPH

El análisis fue realizado según la metodología de Hsu *et al.* (2003). El extracto se obtuvo macerando 1g de semilla en 5 mL de metanol al 80%, posteriormente se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min. Del sobrenadante resultante se tomaron 0.5 mL del extracto y se mezclaron con 2.5 mL de una solución 0.1 mM de DPPH recién preparada, y la

mezcla se incubó durante 60 min en oscuridad y frío. La absorbancia fue medida por espectrofotometría a 517 nm. Para la muestra blanco se reemplazó el extracto por 0.5 mL de metanol. Los valores de la prueba DPPH se obtuvieron con la aplicación de la siguiente formula: % g^{-1} p.f. = $(1 - (A_{517} \text{ muestras} / A_{517} \text{ blanco})) \times 100$.

Prueba del poder reductor

El poder reductor en las semillas fue medido de acuerdo al método descrito por Hsu *et al.* (2003). A 1 mL del extracto que se obtuvo macerando 1 g en 5 mL de metanol al 80% (v/v), se le agrego: 1 mL de buffer fosfato 0.2 M pH 6.6 y 1 mL de $K_3Fe(CN)_6$ al 1% (p/v). Posteriormente la mezcla fue incubada durante 20 min a 50 °C. Después los tubos se enfriaron sumergiéndolos en hielo y se les añadió 0.5 mL de Cl_3CCOOH al 10%. Después, se centrifugaron a 5,000 rpm durante 10 min, se tomó 1 mL del sobrenadante y se mezcló con 1 mL de agua destilada y 0.1 mL de $FeCl_3$ al 0.1% (p/v). La mezcla se incubó por 10 min y la absorbancia fue medida a 700 nm. Los valores de absorbancia más altos indican un mayor poder reductor.

Análisis estadístico

Todos los datos fueron sometidos a análisis de varianza. Para la diferencia entre las medias de los tratamientos se utilizó la prueba de LSD a 95 % (SAS, 1987).

Resultados y Discusión

El selenio (Se) puede incrementar o disminuir el contenido de biomasa de un cultivo según la dosis y forma inorgánica aplicada (selenato o selenito) (Ríos *et al.*, 2008),

llegando a ocasionar una drástica disminución de la biomasa, lo que pudiera ser una reacción de la planta al efecto tóxico del Se, ya que aparece cuando el nivel de daño oxidativo supera a la capacidad del sistema de defensa antioxidante, o excede la capacidad para construir de selenocompuestos potencialmente reactivos a selenoproteínas o convertirlos a las formas no-activas (Yan y Spallholz, 1993). En los resultados se encontraron diferencias significativas en la acumulación de biomasa total únicamente al aplicar selenito de sodio. La mayor reducción se presentó en el tratamiento de 160 μM (Cuadro 1; $P \leq 0.05$), alcanzando un decremento del 45.7 % con respecto al control. El resultado se atribuye a un efecto tóxico del Se, al actuar como prooxidante a dosis altas.

Con respecto a la producción de frutos (Figura 1; $P \leq 0.05$), las dosis de aplicación de Se que más aumentaron el rendimiento fueron 40 μM de selenito y 20 μM de selenato, con un incremento de 2.8 y 8.0%, respectivamente, en relación al control. Lo que indica que la influencia del Se sobre la biomasa de los cultivos está relacionada con la capacidad que tenga la planta para tolerar diferentes cantidades y fuentes de Se sin llegar a ser fitotóxicas.

Como ya se mencionó anteriormente, el Se no es nutriente esencial para las plantas, a pesar de esto puede ser absorbido y acumulado en los tejidos. Para el fruto del frijol, dicha acumulación se vió favorecida al aplicar selenito (Figura 2; $P \leq 0.05$), presentando la mayor acumulación en la dosis de 160 μmol , lo que podría ser beneficioso para la producción de formas orgánicas. Li *et al.* (2008) encontraron que el 90% del Se aplicado se transportó al fruto en el cultivo de trigo. Esto es importante en

un programa de biofortificación dado el papel que juega el Se en la salud humana (Duffield *et al.*, 2002).

El frijol contiene metabolitos secundarios como taninos, antocianinas y compuestos fenólicos, entre otros (Guzmán *et al.*, 1996; De Mejía *et al.*, 2003), los cuales tienen propiedades antioxidantes (Lazze *et al.*, 2003). En los resultados de fenoles totales se presentaron diferencias significativas al aplicar las diferentes dosis y formas de Se (Figura 3; $P \leq 0.05$). La dosis de 160 μM fue la que más favoreció el contenido de estos metabolitos secundarios, superando al control con un 33%. Lo que podría explicar por qué en esta dosis de aplicación encontramos menor rendimiento, ya que existen evidencias de que el selenito de sodio activa la enzima polifenol oxidasa (PPO), de la cual el sustrato son los fenoles (Nowak *et al.*, 2004).

Como ya se mencionó, el frijol tiene capacidad antioxidante, a pesar de esto, en ambas formas de aplicación de Se se presentaron diferencias significativas (Figura 4; $P \leq 0.05$), lo que indica que el Se incrementó la capacidad antioxidante del frijol, encontrando su máximo en la dosis de 160 μM de selenito. Esto coincide con la mayor concentración de fenoles totales, contrario a lo que reporta Xu y Hu (2004), quienes indican que el incremento de polifenoles al aplicar selenito de sodio no coincide con el aumento de la capacidad antioxidante en el cultivo de arroz; esto es posiblemente debido a la variabilidad en los métodos para medir la capacidad antioxidante.

El poder reductor de un compuesto puede servir como un indicador importante de su potencial actividad antioxidante (Meir *et al.*, 1995). Respecto a esta prueba, se encontraron diferencias significativas en ambas formas de aplicación de Se (Figura 5; $P \leq$

0.05), encontrando que coincide el mayor poder reductor con la mayor capacidad antioxidante del frijol, y el mayor contenido de compuestos fenólicos en la dosis de 160 μM de selenito. Estos resultados coincide con Yildirim *et al.* (2001), quienes determinaron el poder reductor en hojas y semillas de *Rumex crispus* L., confirmando un aumento en función de la concentración de compuestos fenólicos, presentando una correlación estadísticamente significativa ($r = 0.99$). Por lo que el poder reductor de un compuesto puede servir como un indicador de su actividad antioxidante (Yildirim *et al.*, 2001).

Conclusión

Los resultados encontrados indican que para el cultivo del frijol es favorable la fertilización con Se ya que incrementó el rendimiento en las dosis de 40 μM de selenito y 20 μM de selenato, con un incremento de 2.8 y 8.0%, respectivamente, en relación al control. Además, el mayor incremento en el contenido de compuestos fenólicos fue en la dosis de 160 μM de selenito, en un 33% en relación al control, con lo que también aumentó la capacidad antioxidante de las semillas de frijol.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto de Ciencia Básica de CONACYT con clave 081055. Además, agradecemos al CONACYT por la beca otorgada a Martha Aracely Hermosillo Cereceres para realizar estudios de Doctorado dentro del Posgrado del CIAD.

Bibliografía

- Anderson, J.W., Story, L., Sieling, B., Chen, W.J.L., Petro, M.S., & Story, J. (1984). Hypocholesterolemic effects of oat-bran or bean intake for hypercholesterolemic men. *American Journal of Clinical Nutrition*, 48, 749-753.
- Bazzano, L., He, J., Ogden, L.G., Loria, C., Vupputuri, S., Myers, L., & Whelton, P.K. (2001). Legume consumption and risk of coronary heart disease in US men and women. *Archives of Internal Medicine*, 163, 2573-2578.
- Cartes, P., Jara, A.A., Pinilla, L., Rosas, A., & Mora, M.L. (2010). Selenium improves the antioxidant ability against aluminium-induced oxidative stress in ryegrass root. *Annals of Applied Biology*, 156, 297-307.
- Combs, G.F. (2001). Review article. Selenium in global food systems. *British Journal of Nutrition*, 85, 517-547.
- De Mejía, E., Guzmán, M.S.H., Acosta, G.J., Reynoso, A., Camacho, R., Ramírez, R.E., González, Ch.M.M., Castellanos, J.Z., & Kelly, J. (2003). Effect of cultivar and growing location on the trypsin inhibitors, tannins, and lectins of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in the semiarid highlands of Mexico. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5962-5966.
- Dietary References Intakes (2000) National Research Council, Washington: National Academy Press. pp. 284-319.
- Ducsay L., Ložek O., & Varga L. (2009). The influence of selenium soil application on its content in spring wheat. *Plant Soil and Environment*, 55, 80-84.
- Duffield, L.A.J., Reid, M.E., Turnbull, B.W., Combs, G.F., Slate, E.H., Fischbach, L.S., Marshall, J.R., & Clark, L.C. (2002). Baseline characteristics and the effect of selenium supplementation on cancer incidence in a randomized clinical trial: a summary report of the Nutritional Prevention of Cancer Trial. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 11, 7:630-639.
- Guzmán, M.H., Castellanos, R.J.Z., & González, M.E. (1996). Relationship between theoretical and experimentally detected tannins of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry*, 55, 333-335.
- Hartikainen, H., Xue, T., & Piironen, V. (2000) Selenium as an antioxidant and pro-oxidant in ryegrass. *Plant Soil*, 225, 193-200.

- Hawrylak, N.B. (2009). Beneficial effects of exogenous selenium in cucumber seedlings subjected to salt stress. *Biological Trace Elements Research*, 132, 259-269.
- Hawrylak, N. B., Matraszek, R., & Szymanska, M. (2010). Selenium modifies the effect of short-term chilling stress on cucumber plants. *Biological Trace Elements Research*, 138, 307-315.
- Hsu, C.L., Chen, W., Weng, Y.M., & Tseng, C.Y. (2003). Chemical composition, physical properties, and antioxidant activities of yam flours as affected by different drying methods. *Food Chemistry*, 83, 85-92.
- Lazze, M.C., Pizzala, R., Savio, L.A., Stivala, E.P., & Bianchi, L. (2003). Anthocyanins protects against DNA damage induced by tert-butyl hydroperoxide in rat smooth muscle and hepatoma cells. *Mutation Research*, 535, 103-115.
- Li, H.F., McGrath, S.P., & Zhao, F.J. (2008). Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite. *New Phytologist*, 178, 92-102.
- Lin, Z.Q. (2005). Bioaccumulation. In *Water Encyclopedia: Surface and Agricultural Water*, Lehr, J. H., and J. Keeley (Eds). Hoboken, NJ: John Wiley, pp. 34-36.
- Lu, J., & Holmgren, A. (2009) Selenoproteins minireview. *The Journal of biological chemistry*, 284, 723-727.
- Lyons, G.H., Stangoulis, J. C. R., & Graham, R.D. (2005). Tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.) to high soil and solution selenium levels. *Plant Soil*, 270, 179-188.
- Meir, S., Kanner, J., Akiri, B., & Hadas, S.P. (1995). Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 1813-1819.
- Nowak, J., Kaklewski, K., & Ligocki, M. (2004). Influence of selenium on oxidoreductive enzymes activity in soil and in plants. *Soil Biology & Biochemistry*, 36, 1553-1558.
- Rani, N., Dhillon, K.S., & Dhillon, S.K. (2005) Critical levels of selenium in different crops grown in an alkaline silty loam soil treated with selenite-Se. *Plant Soil*, 277, 367-374.

- Rayman, M.P. (2000) The importance of selenium to human health. *Lancet*, 356, 233-241.
- Ríos, J.J., Rosales, M.A., Blasco, B., Cervilla, L.M., Romero, L., & Ruiz, J.M. (2008). Biofortification of Se and induction of the antioxidant capacity in lettuce plants. *Scientia Horticulturae*, 116, 248-255.
- Sánchez, E., Rivero, R.M., Ruiz, J.M., & Romero, L. (2004). Changes in biomass, enzymatic activity and protein concentration in roots and leaves of green bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Strike) under high NH₄NO application rates. *Scientia Horticulturae*, 99, 237-248.
- SAS (1987). SAS/STAT Guide for Personal Computers. Version 6; Statistical Analysis System Institute, Inc., Cary, NC, pp. 1028-1056.
- Singleton, V.L., Salgues, M., Zaya, J., & Trousdale, E. (1985). Caftaric acid disappearance and conversion to products of enzymic oxidation in grape must and wine. *American Journal of Enology and Viticultur*, 36, 50-56.
- Terry, N., Zayed, A.M., De Souza, M.P., & Tarun, A.S. (2000) Selenium in higher plants. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51, 401-432.
- U.S.D.A., (2003) Dietary reference intakes: Elements. <http://www.nap.edu>. 15 Junio 2010.
- Valkama, E., Kivimaenpaa, M., Hartikainen, H., & Wulff, A. (2003). The combined effects of enhanced UV-B radiation and selenium on growth, chlorophyll fluorescence and ultrastructure in strawberry (*Fragaria ananassa*) and barley (*Hordeum vulgare*) treated in the field. *Agricultural and Forest Meteorology*, 120, 267-278.
- Xu, U.J., & Hu, Q. (2004). Effect of foliar application of selenium on the antioxidant activity of aqueous and ethanolic extracts of selenium-enriched rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1759-1763.
- Yadav, S., Gupta, S., Prakash, R., Spallholz, J., & Prakash, N.T. (2007). Selenium uptake by *Allium cepa* Grown in Se-spiked soils. *American Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science*, 2, 80-84.

- Yan, L., & Spallholz, J.E. (1993). Generation of reactive oxygen species from the reaction of selenium compounds with thiols and mammary tumor cells. *Biochemical Pharmacology*, 45, 429-437.
- Yao, X., Chu, J., & Wnag, G. (2009). Effects of selenium on wheat seedling under drought stress. *Biological Trace Element Research*, 130, 283-290.
- Yildirim, A., Mavi, A., & Kara, A.A. (2001). Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4083-4089.
- Zeng, H., & Combs, G.F. (2008) Selenium as an anticancer nutrient: roles in cell proliferation and tumor cell invasion. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 19, 1-7.

Tabla 1. Biomasa total de frijol cv. Strike bajo diferentes dosis de selenato y selenito de sodio (g p.s.). Los datos son las medias \pm error estándar (n=4).

Table 1. Total biomass of bean cv. Strike under different doses of sodium selenate and selenite (g dw.). Data are means \pm standard error (n=4).

Tratamientos	Biomasa total
Selenato de sodio (μmol)	
0	73.65 \pm 0.3 ^a
10	68.72 \pm 4.0 ^a
20	71.37 \pm 3.5 ^a
40	62.62 \pm 5.8 ^a
80	72.41 \pm 8.8 ^a
160	73.66 \pm 0.5 ^a
Selenito de sodio (μmol)	
0	73.65 \pm 0.3 ^a
10	73.11 \pm 1.5 ^a
20	66.43 \pm 0.9 ^b
40	69.24 \pm 1.0 ^{ab}
80	58.20 \pm 2.2 ^c
160	39.98 \pm 2.0 ^d

Diferentes superíndices indican que existe diferencias significativas a $p \leq 0,05$.

Different superscripts indicate significant differences a $p \leq 0,05$.

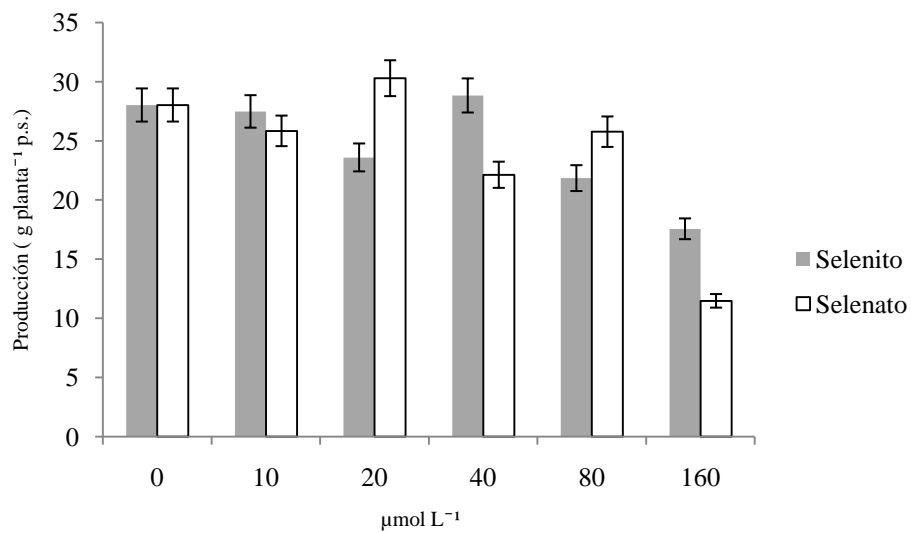


Figura 1. Efecto de la aplicación de diferentes dosis de selenito y selenato sobre la producción de semillas de frijol (g p.s.). Los datos son las medias \pm error estándar (n=4).

Figure 1. Effect of applying different doses of selenite and selenate on bean seed production (g dw.). Data are means \pm standard error (n=4).

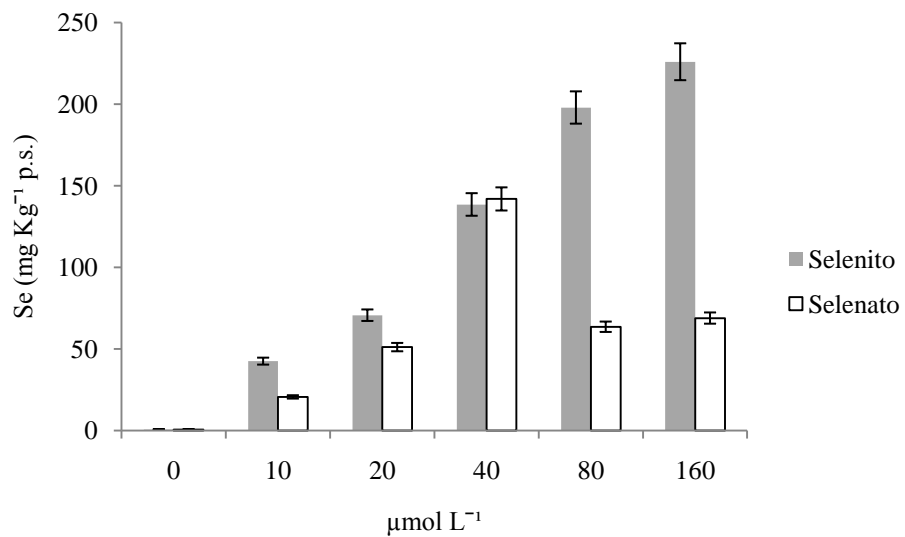


Figura 2. Concentración de Se en la semilla de frijol bajo diferentes dosis y formas de Se ($\text{mg kg}^{-1} \text{ p.s.}$). Los datos son las medias \pm error estándar ($n=4$).

Figure 2. Concentration of Se in bean seed under different doses and forms of Se ($\text{mg kg}^{-1} \text{ dw}$). Data are means \pm standard error ($n=4$).

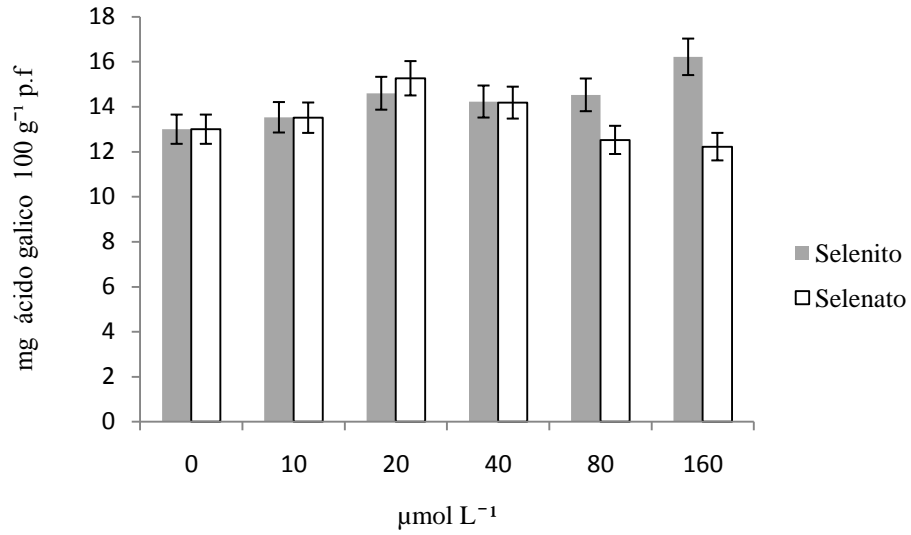


Figura 3. Concentración de fenoles totales en semillas de frijol bajo diferentes dosis y formas de Se (μg ácido galico $100 \text{ g}^{-1} \text{ p.f.}$). Los datos son las medias \pm error estándar ($n=4$).

Figure 3. Total phenol concentration in bean seed under different doses and forms of Se (μg galic acid $\text{g}^{-1} 100 \text{ f.w.}$). Date are means \pm standard error ($n=4$).

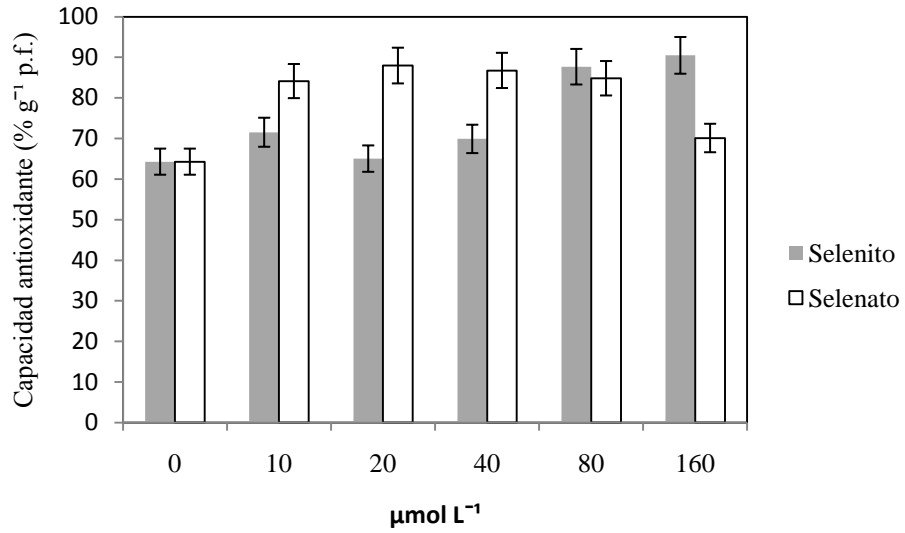


Figura 4. Prueba de capacidad antioxidante (DPPH) en semillas de frijol bajo diferentes dosis y formas de Se. Los datos son las medias \pm error estándar (n=4).

Figure 4. Test of antioxidant capacity (DPPH) in bean seed under different doses and forms of Se. Data are means \pm standard error (n=4).

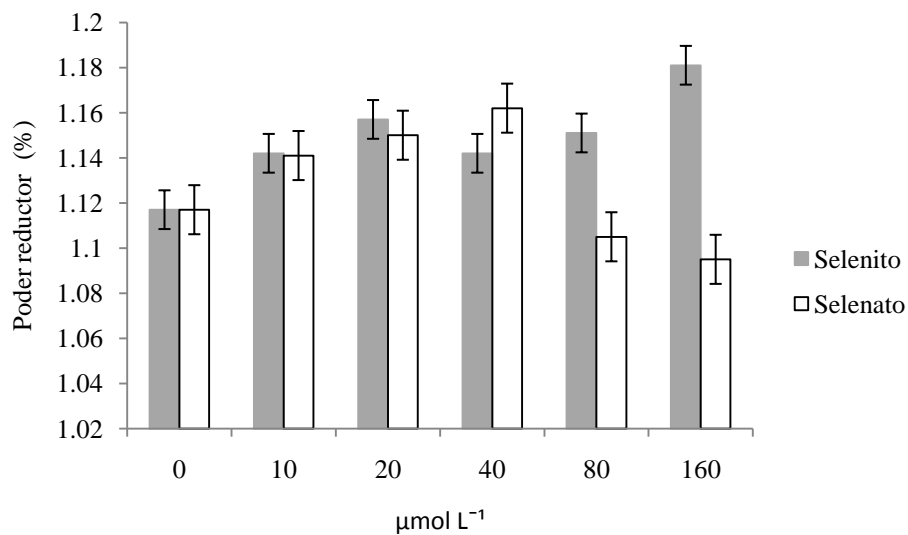


Figura 5. Prueba del poder reductor en semillas de frijol bajo diferentes dosis y formas de Se. Los datos son las medias \pm error estándar (n=4).

Figure 5. Test of reducing power in bean seeds under different doses and forms of selenium. Data are means \pm standard error (n=4).

CAPÍTULO VI

Biofortificación agronómica con selenio y su efecto en la calidad nutricional del frijol

**Martha Aracely Hermosillo¹, Esteban Sánchez Chávez^{1*}, Graciela Dolores Ávila¹,
Ana María Mendoza² y René Renato Balandrán²**

¹ *Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Coordinación Delicias, Av. 4^a Sur 3820, Fraccionamiento Vencedores del Desierto, Cd. Delicias, Chihuahua, C. P. 33089, México.* ² *Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal, Km. 0.6 Carretera a la Victoria, Cd. Hermosillo, Sonora, C. P. 83304, México.*
Correspondencia: esteban@ciad.mx.

Artículo en preparación para su posible envío a: *Journal of the Science of Food and Agriculture.*

Resumen

Actualmente existe la problemática de desnutrición por micronutrientes, se estima que más de la mitad de la población mundial padece deficiencias de al menos un elemento tarza como el hierro (Fe), zinc (Zn), iodo (I) y selenio (Se), por lo que se considera la biofortificación como una estrategia adecuada para integrar el Se a los cultivos. El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la biofortificación con Se en forma de selenito y selenato en la calidad nutricional (macro y micronutrientes) de semillas de frijol cv. Strike. Seis dosis de selenato y selenito de sodio fueron probadas (0, 10, 20, 40, 80 y 160 μM) durante 40 días, las cuales se adicionaron mediante el sistema de fertirrigación. Los resultados indicaron que es viable implementar un programa de biofortificación con Se, ya que hubo un aumento en la acumulación en la semilla de elementos esenciales para la salud humana como el selenio (Se), potasio (K), fierro (Fe) y zinc (Zn), al aplicar las dosis de 40 μM de selenito y 20 μM de selenato. Además, encontramos un aumento en el rendimiento bajo dichas dosis aplicadas.

Palabras clave: *Phaseolus vulgaris*, Strike, deficiencias, producción.

INTRODUCCIÓN

La calidad de los cultivos, así como un adecuado crecimiento y desarrollo están íntimamente ligados con una adecuada composición mineral. La biofortificación se define como el proceso de incrementar las concentraciones biodisponibles de elementos esenciales en la parte comestible de las plantas cultivadas a través de manejo agronómico y mejoramiento genético tradicional o biotecnológico,^{1,2,3} con el fin de mejorar la calidad nutricional de los alimentos de origen vegetal.

Uno de los cultivos en proceso de biofortificación es el frijol, y se está intentando mejorar sus contenidos de Fe y Zn. Existen varias razones para la biofortificación de este cultivo, la primera es que representa la leguminosa de mayor consumo directo en el mundo y es considerada una buena fuente de minerales y proteína,⁴ siendo importante

fuelle vegetal de Fe y Zn.⁵ Sin embargo, poco se ha hecho en este cultivo para incrementar el contenido de selenio (Se). El Se es un micronutriente que ha sido ampliamente estudiado bajo el termino de biofortificación en diferentes cultivos, entre los cuales destacan la lechuga,⁶ maíz,⁷ entre otros.

El Se aún no ha sido clasificado como elemento esencial para las plantas, sin embargo algunos estudios han demostrado que cantidades bajas de Se pueden aumentar el crecimiento y el rendimiento de algunas especies,^{6,8} mientras que altas concentraciones pueden llegar a ser tóxicas.⁹ La respuesta de las plantas al Se puede variar dependiendo de tres factores: la concentración en el suelo, la forma química aplicada y su acumulación.

Al aplicar el Se en forma de selenito, este es rápidamente transformado a las formas orgánicas de Se y estas pueden ayudar a una mejor absorción de elementos esenciales como el potasio (K).¹⁰ Sin embargo, en trigo se ha observado que la aplicación de Se en forma de selenato no afecta la absorción de K.¹¹

El Se al ser suministrado en concentraciones altas puede llegar a ser tóxico para las plantas, afectando la absorción de elementos esenciales como el fósforo (P) y el azufre (S).^{12,13} De manera general, se considera que el Se puede inhibir la absorción de elementos como manganeso (Mn), zinc (Zn), cobre (Cu) y fierro (Fe).¹⁴ Sin embargo, existen reportes de que el Se puede incrementar el contenido de Fe en la lechuga cuando esta es cultivada en parcela. Mientras que en macetas se reporta que el Se disminuye la absorción de este nutriente.¹⁵

La calidad nutricional de los cultivos es uno de los parámetros más importantes a tomar en cuenta al hablar de alimentación, ya que determinan la funcionalidad de los mismos en la dieta. La concentración de nutrientes es por tanto, un determinante en la calidad de los cultivos básicos.¹⁶ En base a lo anterior, el objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de la biofortificación con Se en forma de selenito y selenato en la calidad nutricional (macro y micronutrientes) de semillas de frijol cv. Strike.

MATERIALES Y MÉTODOS

Manejo del cultivo y diseño experimental

Las semillas de *Phaseolus vulgaris* L., cv. Strike se germinaron y crecieron en una mezcla de sustrato (turba, vermiculita y perlita en proporción 3:1:1) en macetas de plástico, de 30 cm de diámetro, en un invernadero experimental ubicado en Delicias, Chihuahua, México, a una temperatura media dentro del invernadero de 25 ± 4 °C. Durante todo el ciclo del cultivo las plantas recibieron una solución nutritiva compuesta por: 6 mM de NH_4NO_3 , 1,6 mM de K_2HPO_4 , 2,4 mM de K_2SO_4 , 4,0 mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,4 mM de MgSO_4 , 5 μM de Fe-EDDHA, 2 μM de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1,0 μM de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25 μM de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,3 μM de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y 0,5 μM de H_3BO_3 preparada con agua destilada.¹⁷ El pH de la solución nutritiva osciló entre 5,5 y 6,0.

Las fuentes de Se empleadas fueron selenito (Na_2SeO_3) y selenato de sodio (Na_2SeO_4), en concentraciones de 10, 20, 40, 80 y 160 μM , las cuales fueron adicionadas a la solución nutritiva a los 20 días después de la siembra y durante 40 días. El diseño experimental fue completamente al azar con cinco tratamientos de selenito y

cinco de selenato, con cuatro repeticiones por tratamiento y un control sin la aplicación de Se.

Muestreo vegetal

Las plantas fueron muestreadas a los 60 días después de la germinación, cuando estaban en la etapa fenológica de desarrollo completo y madurez del fruto. Se separaron los diferentes órganos de la planta de frijol (hoja, raíz, tallo, pecíolo, semilla y vaina), se lavaron tres veces con agua de la llave y una cuarta vez con agua desionizada.

Biomasa total y rendimiento

La biomasa se determinó con el promedio de peso seco de toda la planta. El rendimiento se expresó como el peso medio del fruto por planta en gramos de peso seco (g p.s.). Los frutos del frijol fueron pesados en el muestreo de cada planta.

Determinación de la calidad nutricional (macro y micronutrientes)

El N, P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn y Cu, fueron determinados siguiendo el método de Wolf.¹⁸ Por lo que, 0,2 g de semillas secas fueron mineralizadas con H₂SO₄ 12 N y H₂O₂ al 30 % (v/v) libre de P a una temperatura de 275 a 300 °C. El resultado de la mineralización se aforó a 50 mL de agua desionizada.

La concentración de N total fue determinada por colorimetría, basado en el método de la reacción Berthelot, con algunas modificaciones.¹⁹ La concentración del P total fue determinada usando el método colorimétrico nitrovanadomolibdato.²⁰ La concentración total de K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu y Zn fueron cuantificadas por espectrofotometría de absorción atómica.²¹

Contenido de Se total

Para la determinación del Se, 25 mg de la muestra se digirieron con 2,5 mL de HNO₃ concentrado y 1 mL de H₂O₂ en un horno de microondas. La solución resultante fue diluida en 25 mL de agua desionizada y la concentración de Se fue determinada por Espectrometría de Masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS) de acuerdo a Pedrero *et al.*²²

Análisis estadístico

Todos los datos fueron sometidos a análisis de varianza. Para la diferencia entre las medias de los tratamientos se utilizó la prueba de LSD a 95 %.²³

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La biomasa de un cultivo es uno de los parámetros más importantes a determinar para conocer el nivel de estrés en las plantas.²⁴ Los resultados de biomasa total (Figura 1) muestran una drástica disminución en el tratamiento de 160 µM de selenito, donde hubo una diferencia del 47.5% en relación al control ($P \leq 0,05$), mientras que al aplicar selenato no se encontro diferencia significativa, lo que indica que la aplicación de selenato resultó menos tóxica que la aplicación de selenito.

Con respecto al rendimiento (Figura 2) las mejores dosis de aplicación fueron 40 µM de selenito y 20 µM de selenato, donde se obtuvo un incremento del 2,8 y 8% respectivamente, en relación al control ($P \leq 0.05$). Esto está relacionado con la capacidad del cultivo para tolerar el Se. Dichas dosis acumularon 138 y 51 mg g⁻¹ de Se

respectivamente. Estas cantidades colocan al frijol en una clara ventaja frente a otros cultivos en la acumulación de Se. Ya que la mayoría de las plantas soportan concentraciones de 25 mg g⁻¹ de Se sin presentar toxicidad como disminución en producción.²⁵ Sin embargo, la dosis alta de Se (160 µM), en ambas formas de aplicación, resultaron fitotóxicas, al reducir drásticamente el rendimiento en relación al control. Cultivos como maíz, arroz y trigo presentan tolerancia a Se en niveles de 77, 42 y 19 mg g⁻¹ respectivamente.²⁵

La producción de un cultivo está relacionada con un adecuado aporte de N.^{26,27} En las plantas, los productos finales de la asimilación de N son las proteínas,²⁸ las cuales son esenciales para un adecuado crecimiento del cuerpo humano.²⁹ Los resultados de esta investigación presentaron diferencias significativas en la acumulación de N en las semillas ($P \leq 0.05$, Tabla 1). En todas las dosis y en ambas formas de aplicación se incrementó el contenido de dicho nutriente en comparación al control. Quizá debido a que al adicionar Se al medio de cultivo la planta absorbe más nitrógeno para mantener un equilibrio 20:1 en los compuestos orgánicos nitrogenados y los compuestos orgánico azufrados, esto por la similitud química del S con el Se. Sin embargo, en las dosis que encontramos mayor producción de fruto (40 µM de selenito y 20 µM de selenato) fueron las que menor concentración tuvieron de dicho nutriente, posiblemente por el gasto energético para la producción de proteínas, ya que el mayor sumidero de nitrógeno son las proteínas, que están disponibles en las semillas.³⁰

En el contenido de macrominerales como P, Ca y Mg en la semilla no se encontraron diferencias significativas. Contrario a lo que reportan otros autores que indican que la adición de Se al medio de cultivo incrementa la absorción de dichos

nutrientes.⁷ Por lo que, destaca la importancia de conocer a detalle la interacción de los elementos esenciales con el Se para cada cultivo en particular.

El K es uno de los minerales esenciales para el ser humano, ya que es indispensable para el equilibrio hídrico, producción de enzimas, entre otras funciones.^{31,32} Respecto al contenido de K, se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0,05$, Tabla 1). La mayor acumulación de este elemento se presentó en las dosis de 40 μM tanto de selenito como de selenato, superando al control con 81 y 18% respectivamente. Además, las dosis más altas (160 μM) en ambas formas de aplicación provocaron una disminución del contenido de dicho nutriente en relación al control.

Actualmente, se estima que más de la mitad de la población mundial padece de deficiencias de al menos un elemento traza como el Fe, Zn, I y Se.³³ Lo que resalta la importancia de que los cultivos contengan los microminerales en cantidades adecuadas. En los resultados se encontraron diferencias significativas en el aumento de la concentración de micronutrientes como Zn, Fe y Se con relación al control, en ambas formas de aplicación de Se. Mientras que para Mn solo la aplicación de Se en forma de selenito presentó diferencias significativas ($P \leq 0,05$, Tabla 2). La dosis de 20 μM de selenito, fue la que presentó un mayor aumento en el contenido de Zn, teniendo un incremento del 25% con respecto al testigo. Lo que incrementa el valor nutritivo del frijol, ya que el Zn es un micronutriente implicado en la expresión de los genes, desarrollo y replicación celular.³⁴ Respecto al Fe, las dosis de 20 μM de selenito y 40 μM de selenato fueron las que más favorecieron la acumulación de Fe en comparación al testigo, con un incremento de 39 y 56% respectivamente. Lo que muestra una ventaja de la aplicación de Se para incrementar la calidad nutricional del frijol, ya que el Fe es de

vital importancia para la salud humana. Dado que un adecuado aporte evita problemas como la anemia.³⁵

El Se es de gran importancia para la salud humana como un componente de selenoproteínas, que desempeñan funciones estructurales y enzimáticas.^{36,37} Entre las que destaca la de antioxidante³⁶ y catalizador para la producción de la hormona tiroidea.³⁸ Las altas concentraciones de Se encontradas en la semilla de frijol al aplicar Se en forma de selenito 40 μM (138 mg g^{-1} p.s.) y selenato 20 μM (51 mg g^{-1} p.s.), sugiere la favorable habilidad de la planta para tolerar altas dosis de Se en su fruto sin presentar daño en la disminución del rendimiento. Lo que pudiera atribuirse en primer lugar a que el frijol por ser una planta dicotiledónea presenta una gran permeabilidad en su membrana y esto ayuda a una gran acumulación del Se en la parte aérea de la planta, como lo mencionan Hartikainen y Xue³⁹ que compararon la lechuga que es dicotiledónea con una monocotiledonea, el zacate rye grass.

Son pocos los estudios que analizan el efecto del Se sobre el contenido nutricional de las plantas comestibles después de la aplicación de este nutriente durante todo el ciclo vegetativo del cultivo, dado a los efectos tóxicos del Se en la mayoría de las plantas cuando se aplica a altas dosis y por largos periodos de tiempo. Como lo menciona Yadav *et al.*⁴⁰ que aplicaron selenato (25 y 50 ppm) durante 70 días en el cultivo de la cebolla y observaron una disminución en el rendimiento.

Los resultados presentaron un efecto favorable de la biofortificación con Se en el cultivo de frijol para el aumento en rendimiento. Las mejores dosis fueron 40 μM de selenito y 20 μM de selenato, ya que incrementaron el contenido de Fe, Zn y Se. Por lo

que, aumentaron el valor nutritivo del cultivo. Ya que al consumir 100 gramos del frijol biofortificado con 40 μM de selenito aportaran 6.74 mg de Fe, 2,2. mg de Zn, 2020 mg de K y 13,8 mg de Se. Mientras que consumiendo 100 gramos de frijol biofortificado con 20 μM de seleanto aportaran 8,47 mg de Fe, 2,4 mg de Zn, 1210 mg de K y 5,1 mg de Se. Respecto a esto, el consumo de 100 gramos de la muestra control aportaran menos nutrientes: 6,64 mg de Fe, 2,07 mg de Zn, 1110 mg de K y no aporta Se. Por lo que, el frijol es un cultivo viable para incorporar el Se a la dieta de poblaciones que presenten deficiencias de dicho elemento, por su gran capacidad de acumular este elemento en la parte comestible de la planta (semilla).

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto de Ciencia Básica de CONACYT con clave 081055. Además, agradecemos al CONACYT por la beca otorgada a Martha Aracely Hermosillo Cereceres para realizar estudios de Doctorado dentro del Posgrado del CIAD.

REFERENCIAS

- 1 White PJ and Broadley MR, Biofortifying crops with essential mineral elements. *Trend Plant Sci* **10**:586-593 (2005).
- 2 Nestel P, Bouis HE, Meenakshi JV and Pfeiffer WH, Biofortification of staple food crops. *J Nut* **136**:1064-1067 (2006).
- 3 Johns T and Eyzaguirre P, Biofortification, biodiversity and diet: a search for complementary applications against poverty and malnutrition. *Food Policy* **32**:1-24 (2007).
- 4 Pennington J and Young B, Iron, zinc, copper, manganese, selenium, and iodine in foods from the United States total diet study. *J Food Comp Anal* **3**:166-184 (1990).
- 5 Graham RD, Senadhira D, Beebe SE, Iglesias C and Ortiz MI, Breeding for micronutrient density in edible portions of staple food crops: conventional approaches. Special volume. In: Welch RM, Graham RD, eds. *Field Crops Res* **60**:57-80 (1999).
- 6 Ríos JJ, Rosales MA, Blasco B, Cervilla LM, Romero L and Ruiz JM, Biofortification of Se and induction of the antioxidant capacity in lettuce plants. *Scientia Horticulturae* **116**:248-255 (2008).
- 7 Hawarylak NB, Effect of selenium on selected micronutrients in maize plants. *J Elementol* **13**:513-519 (2008).
- 8 Lyons GH, Genc Y, Soole K, Stangoulis JCR, Liu F and Graham RD, Selenium increases seed production in Brassica. *Plant Soil* **318**:73-80 (2009).
- 9 Harrtikainen H, Xue T and Piironen V, Selenium as an antioxidant and pro-oxidant in ryegrass. *Plant Soil* **225**:193-200 (2000).
- 10 Zayed A, Lytle CM and Terry N, Accumulation and volatilization of different chemical species of selenium by plants. *Planta* **206**:248-92 (1998).
- 11 Filek M, Zembala M, Kornaś A, Walas S, Mrowiec H and Hartikainen H, The uptake and translocation of macro and microelements in rape and wheat seedlings as affected by selenium supply level. *Plant Soil* **336**:303-312 (2010).
- 12 Hopper JL and Parker DR, Plant availability of selenite and selenate as influenced by the competing ions phosphate and sulphate. *Plant Soil* **210**:199-207 (1999).
- 13 White PJ, Bowen HC, Parmaguru P, Fritz M, Spracklen WP, Spiby RE, Meacham MC, Mead A, Harriman M, Trueman LJ, Smith BM, Thomas B and Broadley MR, Interactions between selenium and sulphur nutrition in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* **55**:1927-1937 (2004).
- 14 Fargašová A, Pastierová J and Svetková K, Effect of Se-metal pair combinations (Cd, Zn, Cu, Pb) on photosynthetic pigments production and metal accumulation in *Sinapis alba* L. seedlings. *Plant Soil and Environ* **52**:8-15 (2006).
- 15 He PP, Lv XZ, and Wang GY, Effects of Se and Zn supplementation on the antagonism against Pb and Cd in vegetables. *Environ Int* **30**:167-172 (2004).

- 16 Frossard E, Bucher M, Machler F, Mozafar A and Hurrell R, Potential for increasing the content and bioavailability of Fe, Zn and Ca in plants for human nutrition. *J Sci Food Agric* **80**:861-879 (2000).
- 17 Sánchez E, Rivero RM, Ruiz JM and Romero L, Changes in biomass, enzymatic activity and protein concentration in roots and leaves of green bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Strike) under high NH₄NO₃ application rates. *Sci Hort* **99**:237-248 (2004).
- 18 Wolf B, A comprehensive systems of leaf analysis and its use for diagnosing crop nutrients status. *Comm Soil SciPlant Anal* **13**:1035- 1059 (1982).
- 19 Krom MD, Spectrophotometric determination of ammonia: Study of a modified Berthelot reaction using salicylate and dichloroisocyanurate. *Analyst* **105**:305-316 (1980).
- 20 Hogue E, Wilcox GE and Cantliffe DJ, Effect of soil P on phosphate fraction in tomato leaves. *J Amer Soc Hort Sci* **95**:174-176 (1970).
- 21 Hocking PJ and Pate JS, Mobilization of minerals to developing seeds of legumes. *Ann Bot* **41**:1259-1278 (1977).
- 22 Pedrero Z, Madrid Y and Camara C, Selenium species bioaccessibility in enriched radish (*Raphanus sativus*): A potential dietary source of selenium. *J Agric Food Chem* **54**:2412-2417 (2006).
- 23 SAS. (1987). SAS/STAT Guide for personal computers. Version 6; Statistical Analysis System Institute, Inc. Cary, North Carolina p. 1028-1056.
- 24 Fu J and Huang B, Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. *Env Exp Bot* **45**:105-114 (2001).
- 25 Rani N, Dhillon KS and Dhillon SK, Critical levels of selenium in different crops grown in an alkaline silty loam soil treated with selenite-Se. *Plant Soil* **277**: 367-374 (2005).
- 26 Lal C, Hariprasanna K, Rathnakumar AL, Gor HK and Chikani BM, Gene action for surrogate traits of water-use-efficiency and harvest index in peanut (*Arachis hypogaea*). *Ann Appl Biol* **148**:165-172 (2006).
- 27 Barbanti L, Monti A and Venturi G, Nitrogen dynamics and fertilizer use efficiency in leaves of different ages of P.J. Lea & R.A. Azevedo Nitrogen use efficiency sugar beet (*Beta vulgaris*) at variable water regimes. *Ann Appl Biol* **150**:197-205 (2007).
- 28 Barneix AJ and Causin HF, The central role of amino acids on nitrogen utilization and plant growth. *J Plant Physiol* **149**:358-362 (1996).
- 29 Cano MC, De Pascual-Teresa S and De Ancos B, (2005). Procesado mínimo y valor nutricional en nuevas tecnologías de conservación de productos vegetales frescos cortados. González-Aguilar, G.A., Cuamena-Navarro, F., Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Hermosillo, Sonora, México, pp. 119-149.

- 30 Landry J and Delhaye S, Influence of genotype and texture on zein content in endosperm of maize grains. *Annal Appl Biol* **151**:349-356 (2007).
- 31 Fraga CG, Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. *Mol Asp Med* **26**:235-244 (2005).
- 32 Robles SM, Mercado RJ, Cruz VR and García JR, (2009). Vitaminas y minerales en frutas, y su relación con la nutrición y la salud humana. González, A. G. A., Alvarez, P. E., Dela Rosa, L., Olivas, I. G., Ayala, Z. J. F. Aspectos nutricionales y sensoriales de vegetales fescos cortados. pp. 256-281.
- 33 Organización Mundial de la Salud (2010). <http://www.who.int/world-health-day/2010/es/>.
- 34 Hambridge KM, Human zinc deficiency. *J Nut* **130**:1344-1349 (2000).
- 35 Blair MW, Astudillo C, Grusk MA, Graham R and Beebe SE, Inheritance of seed iron and zinc concentrations in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *Mol Breed* **23**:197-207 (2009).
- 36 Combs GF, Selenium in global food systems. *Brit J Nutr* **85**:517-547 (2001).
- 37 Rayman MP, The argument for increasing selenium intake. *Proc Nutr Soc* **6**:203-215 (2002).
- 38 Thomson CD, McLachlan SK, Grant AM, Paterson E and Lillico AJ, The effect of selenium on thyroid status in a population with marginal selenium and iodine status. *Brit J Nutr* **94**:962-968 (2005).
- 39 Hartikainen H and Xue T, The promotive effects of selenium on plant growth as triggered by ultraviolet irradiation. *J Env Qual* **28**:1372-1375 (1999).
- 40 Yadav S, Gupta S, Prakash R and Prakash T, Selenium uptake by *Allium cepa* grown in Se-spiked soil. *J Agric Environ Sci* **2**:80-84 (2007).

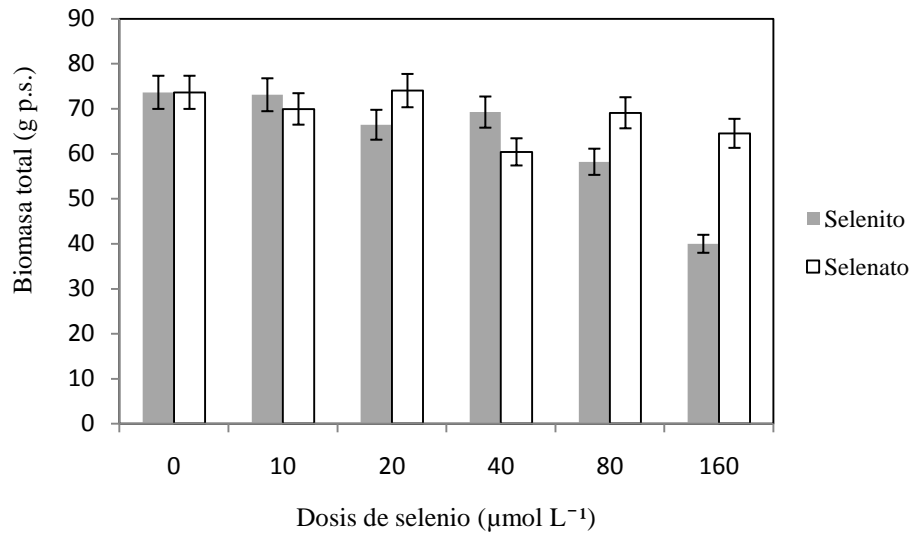


Figura 1. Producción de biomasa total en plantas de frijol cv. Strike bajo diferentes dosis de selenito y selenato. Los datos son las medias \pm error estándar (n=4).

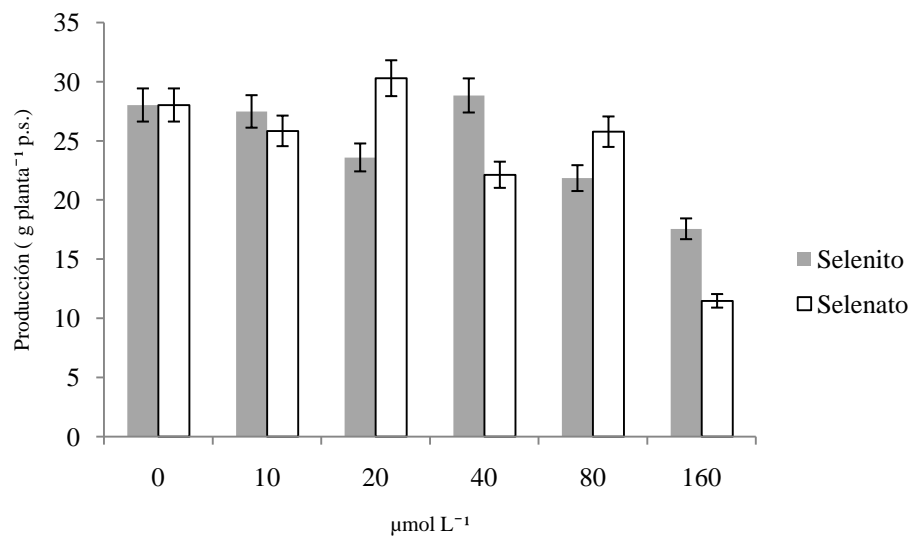


Figura 2. Producción de frijol cv. Strike bajo diferentes dosis de selenito y selenato. Los datos son las medias \pm error estándar (n=4).

Tabla 1. Concentración de macronutrientes en la semilla de frijol cv. Strike bajo diferentes dosis de selenito y selenato.

Dosis	Concentración (g 100 g ⁻¹ de peso seco)				
	N	P	K	Ca	Mg
Na ₂ SeO ₃ (μmol L ⁻¹)					
0	3,11±0,37	0,08±0,003	1,11±0,06	0,07±0,04	0,18±0,01
10	3,67±0,07	0,09±0,015	1,12±0,04	0,03±0,02	0,16±0,002
20	3,70±0,14	0,10±0,008	1,09±0,07	0,05±0,007	0,17±0,01
40	3,35±0,13	0,08±0,014	2,02±0,06	0,04±0,002	0,16±0,01
80	3,64±0,06	0,08±0,0001	1,04±0,01	0,05±0,04	0,17±0,009
160	3,20±0,08	0,06±0,001	0,89±0,01	0,02±0,02	0,14±0,01
Significancia	*	ns	*	ns	ns
Na ₂ SeO ₄ (μmol L ⁻¹)					
0	3,11±0,37	0,08±0,003	1,11±0,06	0,07±0,04	0,18±0,01
10	3,41±0,07	0,08±0,002	1,19±0,01	0,06±0,001	0,16±0,01
20	3,43±0,22	0,09±0,0003	1,21±0,01	0,06±0,03	0,17±0,006
40	3,77±0,09	0,09±0,0001	1,31±0,05	0,13±0,18	0,20±0,07
80	3,92±0,38	0,09±0,012	1,26±0,14	0,15±0,13	0,20±0,02
160	3,61±0,03	0,07±0,006	0,97±0,01	0,05±0,01	0,13±0,007
Significancia	*	ns	*	ns	ns

Los datos son las medias ± error estándar (n=4).

Tabla 2. Concentración de micronutrientes en la semilla de frijol cv. Strike bajo diferentes dosis de selenito y selenato.

Dosis	Concentración (mg Kg ⁻¹ p.s.)				
Na ₂ SeO ₃ (μmol L ⁻¹)	Zn	Cu	Mn	Fe	Se
0	20,71±1,02	6,46±1,32	13,56±2,70	66,45±16,65	0,0062±0,035
10	25,88±1,12	6,49±0,32	10,06±3,64	92,90±23,14	42,45±4,13
20	25,89±2,29	5,23±0,54	5,58±1,00	63,00±14,66	70,67±7,08
40	22,01±0,94	5,07±0,13	4,73±1,07	67,41±4,24	138,46±23,46
80	24,77±1,39	3,84±0,46	3,50±91,69	59,54±9,59	194,86±4,00
160	18,83±0,30	4,27±1,23	5,62±0,57	55,05±1,24	225,90±8,86
Significancia	**	ns	*	*	***
Na ₂ SeO ₄ (μmol L ⁻¹)	Zn	Cu	Mn	Fe	Se
0	20,71±1,02	6,46±1,32	13,56±2,70	66,45±16,68	0,0062±0,035
10	23,71±2,25	5,67±0,35	7,78±2,39	88,47±25,19	20,57±0,22
20	24,68±4,79	7,35±0,85	10,89±3,86	84,72±25,17	51,07±0,66
40	25,57±1,75	6,83±0,56	14,21±6,32	104,27±51,16	141,84±6,34
80	23,69±1,94	5,52±1,77	7,33±1,57	67,98±2,36	63,54±5,92
160	17,67±0,31	5,22±0,01	8,78±0,60	55,70±1,45	68,86±17,52
Significancia	**	Ns	ns	*	***

Los datos son las medias ± error estándar (n=4).

CONCLUSIONES FINALES

- En general el selenato tuvo un efecto más favorable que el selenito en el metabolismo nitrogenado de la planta de frijol.
- La actividad de las enzimas detoxificadoras de H_2O_2 en presencia de Se fue dependiente de la forma química de aplicación (selenito o selenato).
- La aplicación de Se en forma de selenito incrementó más la capacidad antioxidante de las semillas de frijol, en comparación al selenato.
- La fertilización con Se en el cultivo de frijol incrementó la calidad nutricional ya que aumento más el contenido de nutrientes como Fe, Zn al aplicar selenato, mientras que el selenito favoreció más el incremento de K y Se.
- La aplicación de Se a dosis altas presentó un antagonismo con el contenido foliar de micronutrientes, sin embargo, los valores no llegaron a estar por debajo de los límites de suficiencia para el cultivo del frijol.
- Las mejores dosis para biofortificar con Se el cultivo de frijol fueron 20 μM de selenato y 40 μM de selenito.
- Es viable implementar un programa de biofortificación con Se en frijol, ya que este micronutriente se concentró mas en las semillas (parte comestible de la planta), permitiendo mejorar su calidad nutricional y capacidad antioxidante.

PRODUCTIVIDAD

Participación en congresos científicos

- II Congreso Internacional del frijol, Zacatecas, Zacatecas, 5, 6 y 7 de Agosto, 2009. Cartel: **Biofortificación con selenio en frijol: inducción de la capacidad antioxidante.**
- XIII Simposio Ibérico de nutrición mineral de las plantas, Universidad del País Vasco, España, 5, 6 y 7 de Septiembre 2010. Cartel: **Efecto de la aplicación de selenato y selenito sobre el crecimiento, distribución y biofortificación de selenio en plantas de frijol.**
- XIV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Hortícolas, A.C. realizado en Culiacán, Sinaloa, 10 al 14 de abril del 2011. Cartel: **Nitrogen metabolism, biomass and yield response of green bean plants to selenium fertilization.**
- XXXVI Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo, San Francisco de Campeche, Campeche, 21 al 25 de Noviembre 2011. Cartel: **Biofortificación con selenio y su efecto en la calidad nutricional del frijol.**

Capítulo de libro

Efecto de la aplicación de selenato y selenito sobre el crecimiento, distribución y biofortificación de selenio en plantas de frijol. En el libro: Aspectos Fisiológicos y ambientales en la nutrición mineral de las plantas. **ISBN: 978 84 614 3065 9.**

Artículo Publicado

Ionome variation in bean plant growth under different Se forms and application rates. En: *Journal of Food, Agriculture & Environment Vol.9 (3&4): 374-378. 2011.*