

Universidad de Granada
Facultad de Ciencias
Departamento de Fisiología Vegetal



**Biofortificación con Se en plantas de lechuga:
Estudio de la producción, calidad y estado
nutricional.**

Juan José Ríos Ruiz
Tesis Doctoral
Granada, Septiembre 2008

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Juan José Ríos Ruiz
D.L.: GR.1932-2008
ISBN: 978-84-691-5798-5



Universidad de Granada
Facultad de Ciencias



Biofortificación con Se en plantas de lechuga: Estudio de la producción, calidad y estado nutricional.

Memoria de Tesis Doctoral presentada por el licenciado en Biología
Juan José Ríos Ruiz para aspirar al grado de Doctor:

Fdo. Juan José Ríos Ruiz

V^oB^o Los Directores del trabajo:

Fdo.: Dr. Luis M. Romero Monreal
Catedrático - Universidad de Granada

Fdo.: Dr. Juan Manuel Ruiz Sáez
Profesor Titular - Universidad de Granada

Granada, Septiembre 2008

El trabajo que se presenta en esta memoria de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Grupo de Investigación "Diagnóstico Nutricional de las Plantas Cultivadas en Condiciones Adversas" (AGR-161, Plan Andaluz de Investigación, Junta de Andalucía), del Departamento de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada (España). Los resultados presentados en algunos capítulos de esta Tesis Doctoral han sido publicados en las siguientes revistas internacionales:

- *Scientia Horticulturae* 116 (3), 248-255 (2008).
- *Plant Growth Regulation* (In press, DOI 10.1007/S 10725-008-9282-7).
- *Annals of Applied Biology* (Aceptado).

Asimismo, parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han sido presentados en los siguientes congresos nacionales:

- XVI Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal y IX Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal. Évora, Portugal (2005).
- XI Simposio Ibérico de Nutrición mineral de las plantas. Pamplona (2006)
- XVII Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal y X Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal. Alcalá de Henares, Madrid, España (2007).

Durante la realización de esta Tesis doctoral me enorgullece haber contado con el apoyo y afecto de las personas que me han rodeado y que han hecho posible que haya realizado este trabajo:

En primer lugar agradecer a mis padres y hermano por su apoyo incondicional, ánimos y ayuda tanto a lo largo de estos cuatro años de duro trabajo como durante toda mi vida. Por su confianza que han depositado en mí y por darme las lecciones que ningún libro puede enseñar.

A mis directores de tesis, el Dr. Luis M. Romero Monreal y el Dr. Juan Manuel Ruiz Sáez, por la oportunidad que me han brindado, por su paciencia y comprensión, a la vez que por su labor en mi instrucción durante este periodo de trabajo juntos.

A mis compañeros de laboratorio: Luismi, Miguel, M^o del Mar y Eva, así como a Rosa y a Ana, por vuestra colaboración en la realización del trabajo y amistad mostrada día a día. En especial a Bego, por haber sabido sacarme unas risas en los momentos más bajos y disfrutar junto a mí con los más altos.

A Susana, amiga indispensable en mi vida, por todo lo que me has dado en estos años a tu lado, por tantos y tantos buenos momentos juntos, por saber escucharme, aconsejarme siempre, y hacer de mí una mejor persona en todos los ámbitos.

A mis primos (Melí, Carlos...etc.) y a todos mis amigos: Lucí, Carmen, Antonio, Víky, Juan, Pepe, Alberto, Javi,...etc., con los que he disfrutado tantos ratos alegres en buena compañía, y por darme ese toque mágico que hace que cada día sea diferente.

Finalmente a Ale, por lo especial de tu persona que hace que siempre vea la parte positiva a las cosas y hacerme sentir tan bien cada día.

A mis padres y hermano

*Las cadenas de la esclavitud
solamente atan las manos: es la mente lo que hace al
hombre libre o esclavo”.*

Franz Grillparzer (1791-1872)

Índice General

Índice general

Capítulo 1: Introducción general y objetivos	1
1.1. Introducción general	3
1.1.1. Biofortificación: La nueva revolución agrícola	3
1.1.2. ¿Por qué es necesario un programa de biofortificación con plantas?	9
1.2. Objetivos	14
Capítulo 2: Biofortificación de Se e inducción de la capacidad antioxidante en plantas de lechuga	17
2.1. Introducción	19
2.2. Material y Métodos	22
2.2.1. <i>Material vegetal y condiciones de crecimiento</i>	22
2.2.2. <i>Muestras vegetales</i>	25
2.2.3. <i>Análisis vegetal</i>	26
2.2.3.1. <i>Medida de la peroxidación de lípidos</i>	26
2.2.3.2. <i>Determinación de los Grupos Carbonilo</i>	27
2.2.3.3. <i>Determinación de los fenoles totales</i>	27

2.2.3.4. <i>Determinación de los flavonoides</i>	28
2.2.3.5. <i>Determinación del ascorbato total</i>	28
2.2.3.6. <i>Determinación de los PPGs totales</i>	29
2.2.3.7. <i>Ensayo FRAP</i>	29
2.2.3.8. <i>Ensayo DPPH</i>	30
2.2.3.9. <i>Test del Poder Reductor</i>	30
2.2.3.10. <i>Determinación del Se total</i>	31
2.4. <i>Análisis estadístico</i>	31
2.3. <i>Resultados y Discusión</i>	31
2.4. <i>Conclusión</i>	44
Capítulo 3: Regulación de la asimilación del S en plantas de lechuga sujetas al Se	45
3.1. <i>Introducción</i>	47
3.2. <i>Material y Métodos</i>	55
3.2.1. <i>Determinación de la actividad ATP-sulfurilasa</i>	55
3.2.2. <i>Determinación de la actividad SAT</i>	56
3.2.3. <i>Determinación de la actividad OAS-TL</i>	57
3.2.4. <i>Concentración total en cisteína y grupos tioles</i>	57
3.2.5. <i>Concentración en aminoácidos solubles</i>	58
3.2.6. <i>Concentración en proteínas solubles</i>	58
3.2.7. <i>Concentración en S orgánico</i>	58

3.3. Resultados y Discusión	59
3.4. Conclusión	67
Capítulo 4: Producción y detoxificación de H₂O₂ en plantas de lechugas sometidas a Se	69
4.1. Introducción	71
4.2. Material y Métodos	79
4.2.1. <i>Concentración de H₂O₂</i>	79
4.2.2. <i>Concentración en GSH total</i>	80
4.2.3. <i>Determinación de la actividad SOD</i>	80
4.2.4. <i>Determinación de la actividad CAT</i>	81
4.2.5. <i>Determinación de la actividad APX</i>	82
4.2.6. <i>Determinación de la actividad GSH-Px</i>	82
4.3. Resultados y Discusión	83
4.4. Conclusión	90
Capítulo 5: Metabolismo y eficiencia en el uso del N en plantas de lechuga bajo la influencia de Se	91
5.1. Influencia de la aplicación del Se (selenito vs selenato) sobre el Metabolismo nitrogenado	93

5.1.1. Introducción	93
5.1.2. Material y Métodos	101
5.1.2.1. <i>Ensayo de la actividad de la NR</i>	101
5.1.2.2. <i>Ensayo de la actividad de la NiR</i>	102
5.1.2.3. <i>Ensayo de la actividad de la GS</i>	103
5.1.2.4. <i>Ensayo de la actividad de la GOGAT</i>	103
5.1.2.5. <i>Ensayo de la actividad de la GDH</i>	103
5.1.2.6. <i>Concentración de NO₃⁻</i>	104
5.1.2.7. <i>Concentración de NH₄⁺</i>	104
5.1.2.8. <i>Concentración en N orgánico</i>	105
5.1.3. Resultados y Discusión	105
5.1.4. Conclusión	114
5.2. Eficiencia en el NUE en plantas de lechuga bajo la	
Influencia del Se	117
5.2.1. Introducción	117
5.2.2. Material y Métodos	119
5.2.2.1. <i>Cálculo del TNC</i>	120
5.2.2.2. <i>Cálculo del TNA</i>	120
5.2.2.3. <i>Cálculo del NER</i>	120
5.2.2.4. <i>Cálculo del NUtE</i>	120

5.1.2.5. <i>Cálculo del NUpE</i>	120
5.2.3. Resultados y Discusión	121
5.2.4. Conclusión	125
Capítulo 6: Efecto del Se (selenito vs selenato) sobre el estado nutricional en las plantas de lechuga	127
6.1. Introducción	129
6.2. Material y Métodos	133
6.2.1. <i>Determinación de los nutrientes esenciales</i>	134
6.3. Resultados y Discusión	136
6.4. Conclusión	143
Conclusiones	145
Bibliografía	149

Capítulo 1
Introducción General y Objetivos

1.1. Introducción general

1.1.1. Biofortificación: La nueva revolución agrícola

A lo largo de la historia de la humanidad la agricultura ha sido la base de la alimentación de las distintas poblaciones. Sin embargo ha sido en los últimos años donde la mejora genética de las cosechas y el progreso en la modernización de las técnicas agrícolas, para la realización de esta tarea, ha sido determinante en la mejora de la calidad y producción de los alimentos vegetales básicos. A pesar de esto, la producción agrícola era insuficiente para mantener el ritmo de crecimiento de la población hasta la llamada “Revolución Verde” entre los años 1950 y 1960, donde mediante el uso de fertilizantes y pesticidas principalmente, se produjo un incremento de la producción de las cosechas, permitiendo así, cubrir las necesidades de la población de estos productos primarios, principalmente en los países en vías de desarrollo. Pero esta primera revolución agrícola solo se centro en la producción de las cosechas (fundamentalmente de arroz y trigo), seleccionando las variedades más productivas, y llevando a la agricultura en muchos casos al monocultivo, disminuyendo por tanto la variabilidad de las plantas cultivadas y la calidad nutricional de los productos obtenidos a partir de dicha revolución (Timmer, 2003).

Actualmente, la producción agrícola mundial es suficiente, aunque la sociedad no solo demanda una gran producción, sino que necesita productos con una alta calidad nutricional, capaces de satisfacer las necesidades nutricionales humanas tras su consumo. Los humanos requieren más de 22 elementos minerales para cubrir sus necesidades fisiológicas alimentarias. Algunos de estos elementos son requeridos en elevadas cantidades como son por ejemplo el Calcio (Ca) y el Fósforo (P). Sin embargo, otros como las vitaminas, Hierro (Fe), Zinc (Zn), Cobre (Cu), Selenio (Se) e Iodo (I) sólo son necesarios en pequeñas cantidades (Welch y Graham, 2004; White y Broadley, 2005).

A pesar de ser estos los nutrientes esenciales requeridos en menor cantidad en la dieta humana actual, se observa que existen deficiencias en dichos elementos.

Así se estima que de 6 billones de personas, 60-80% son deficientes en Fe, más del 30 % son deficientes en Zn, el 30 % en I, y un 15 % aproximadamente en Se (White y Broadley, 2005). Además de los minerales, las vitaminas también son importantes en la alimentación humana, ya que muchas de ellas no son sintetizadas por el organismo. Por tanto, las principales deficiencias en estos compuestos se producen en la vitamina A, y en el folato (vitaminas B) (White et al., 2004; Stein et al., 2006; Bekaert et al., 2007; Díaz de la Garza et al., 2007).

Las deficiencias en estos elementos minerales o compuestos repercuten en la salud de la población, afectando mayoritariamente a niños, adolescentes y mujeres embarazadas, y a pesar de encontrarlas en los países desarrollados, afectan principalmente a los países en vías de desarrollo, donde se incrementa dado su pobre y escasa alimentación (Wech, 2002; King, 2002; Nestel et al., 2006; Campos- Bowers y Wittenmyer, 2007; Ortiz-Monasterio et al., 2007; Mayer et al., 2008).

La deficiencia en Fe es de la más extendida en el mundo, estando ligada a muchas enfermedades como la anemia y en muchas de las muertes de mujeres embarazadas y neonatos, además de ser causa de abortos. Principalmente la encontramos en el sur de Asia y África, aunque los grupos de población con más riesgo son aquellos cuya dieta esta basada principalmente en productos vegetales con bajo contenido en este elemento y poco consumo de carne (Ortiz-Monasterio et al., 2007; Yang et al., 2007).

La deficiencia en Zn, también esta muy extendida por el mundo, es un elemento implicado en la expresión de los genes, desarrollo y replicación celular (Hambridge, 2000). A este micronutriente se le atribuye el incremento de padecer diarreas, neumonía y malaria, además de asociarse su deficiencia con un incremento en la mortalidad en niños menores de 5 años. Las regiones más afectadas por esta deficiencia son el sur de Asia y África subsahariana, principalmente afectando a niños (Caulfield y Back, 2004).

En cuanto al I su deficiencia esta extendida por todo el mundo, y esta asociada con la deficiencia de Se, afectando principalmente a los recién nacidos

provocándoles hipotiroidismo congénito. En mujeres principalmente la deficiencia de I altera el metabolismo del tiroides (Yang et al., 2007). Como acabamos de indicar el I y el Se son elementos muy relacionados, por lo que normalmente existen deficiencias de ambos elementos en las mismas regiones. El Se, cuando es deficiente, provoca dos enfermedades características, Keshan y Kaschin-Beck, que principalmente también afectan a mujeres y niños, y que muestran una distribución parecida (Yang et al., 2007). La enfermedad de Keshan es una cardiopatía inducida principalmente por la deficiencia de Se y vitamina A, se produce por un deterioro de la función cardíaca que provoca arritmias, siendo mortal en los recién nacidos (Lyons et al., 2003). Por otro lado, la enfermedad de Kaschin-Beck, es una osteoartropatía que afecta al cartílago epifisiario, articular y a las placas de crecimiento óseas de los huesos largos, provocando un acortamiento de los dedos de las manos y pies y extremidades, produciendo en casos graves enanismo (Gerald y Combs, 2001).

La vitamina A es un nutriente importante, y su deficiencia representa uno de los principales problemas de salud mundial, ya que principalmente la obtenemos de alimentos vegetales. La deficiencia esta estando implicada en la muerte de muchos niños al año, provocando además cegueras en mujeres jóvenes y niños pequeños (Li et al., 2007).

Por lo general todos los síntomas de deficiencia de elementos minerales y vitaminas que acabamos de describir se manifiestan normalmente en casos muy severos, presentando la mayoría de la población lo que se denomina como malnutrición asintomática (Campos-Bowers y Wittenmyer, 2007).

Dado que la mayoría de estos micronutrientes son tomados principalmente a través de la ingestión de los vegetales, y que el contenido de los mismos en las cosechas no es muy elevado, en los últimos años se esta investigando sobre una novedosa forma de enriquecer los productos vegetales destinados tanto al consumo humano como al ganado en estos micronutrientes esenciales a través de los denominados programas de **biofortificación** (Welch, 2002).

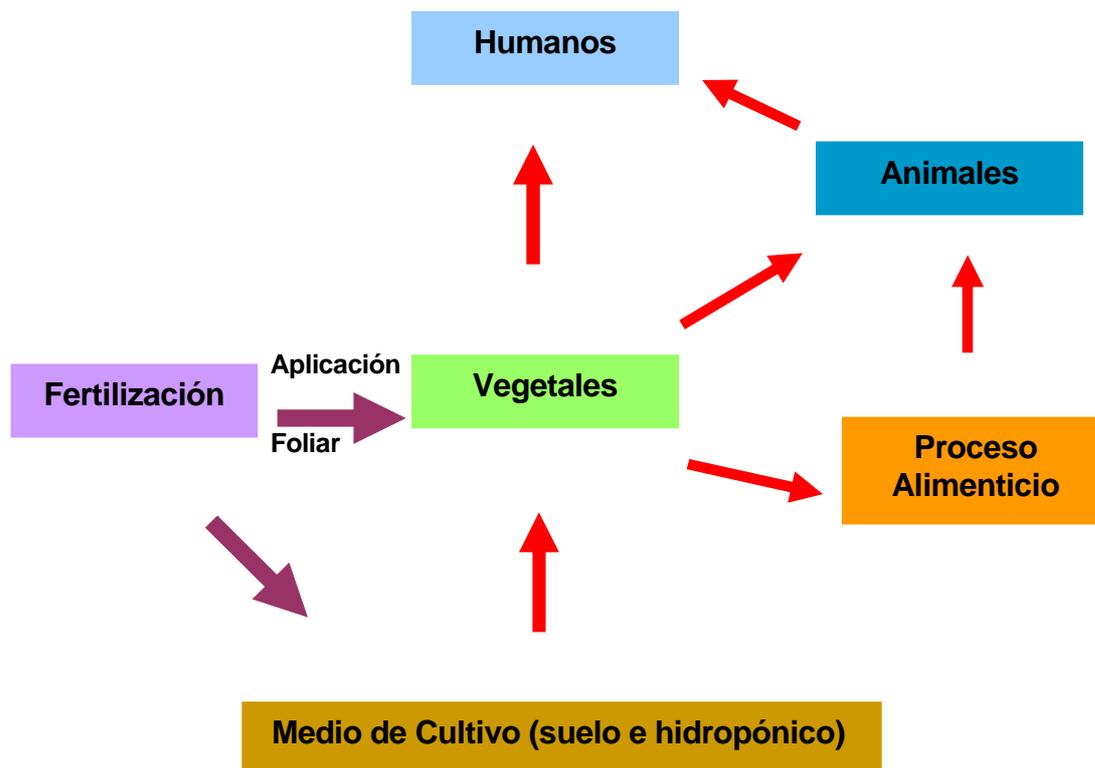


Imagen 1.1: Ciclo de nutrientes en la biofortificación

Así, la **biofortificación** fue definida por White y Broadley (2005) como el proceso de incrementar la concentración biodisponible de elementos esenciales en la parte comestible de los productos cosechados mediante la intervención agronómica o la selección genética. Posteriormente, Campos-Bowers y Wittenmyer (2007), definieron a la biofortificación como una técnica relativamente nueva que implica la mejora de las principales variedades de plantas cosechadas con el fin de incrementar los niveles de nutrientes específicos en los tejidos vegetales requeridos para el consumo humano o animal. La biofortificación por tanto muestra potencial para beneficiar a humanos, plantas y ganado, enriqueciendo a los suelos de nutrientes y ayudando a aumentar la producción agrícola por hectárea. Sin embargo esta técnica agrícola es compleja ya que para que sea eficaz hay que considerar factores como: la selección de variedades, reducción de antinutrientes e incremento de sustancias que promuevan la absorción de nutrientes. Además de estos factores para llevar a cabo con éxito un programa de biofortificación hay que superar una serie de barreras que pueden reducir el efecto beneficioso de dicho proceso (King, 2002). En primer lugar, la dificultad más

importante es conocer con exactitud la concentración del micronutriente necesaria en la rizosfera, ya que un incremento en la biodisponibilidad de dicho elemento en la rizosfera aumentara la absorción del mismo por las plantas. Por otro lado también hay que considerar la absorción del elemento puede ser incrementada mediante la estimulación de ciertos procesos en las células radiculares que pueden aumentar la solubilidad y movimiento del nutriente, lo cual se puede conseguir mediante la estimulación de eflujos radiculares, como H^+ , aplicación de sustancias quelatantes y una mayor superficie radicular (Welch, 2002). En segundo lugar, las células radiculares de las plantas deben poseer en la membrana plasmática mecanismos de absorción que deben ser suficientes y bastantes específicos para permitir la acumulación del metal una vez entre en el apoplasto de las células radiculares desde la rizosfera (Welch, 2002). Y por último, y en tercer lugar, los micronutrientes deben ser eficientemente translocados hacia las partes comestibles de las plantas y allí acumulados sin provocar efectos tóxicos para la planta. Es decir, debemos de tener en cuenta la capacidad de movimiento del elemento hacia el grano, frutos y otras partes comestibles de la planta (Welch, 1986, 2002).

Finalmente, otro factor a considerar es la forma de consumo de estos vegetales, ya que procesos como el cocinado, la molienda y la fermentación pueden disminuir la biodisponibilidad del elemento para el humano después de estos procesos, implicando por tanto un estudio del vegetal a cultivar junto con el elemento a incrementar (Underwood, 1999; Bouis, 1996).

En definitiva, y como acabamos de comentar, la biofortificación de plantas con cualquier nutriente es un proceso complejo que requiere de investigación previa antes de ser llevado a la práctica. Sin embargo, la importancia que actualmente tiene la nutrición humana y las posibilidades que abre la biofortificación en la mejora de la calidad de vida en la población mundial, ha hecho que esta mejora agrícola este siendo impulsada por distintos organismos mundiales como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Grupo Consultivo Internacional sobre Investigación Agrícola (CGIAR) en su programa de investigación Harvest Plus (Johns y Eyzaguirre, 2007).

Los primeros trabajos sobre biofortificación nos llevan a principios de la presente década, donde Welch (2002) y King (2002), indican esta posibilidad de cultivo, y su importancia sobre la salud, sugiriéndonos la viabilidad del proceso. Posteriormente los primeros trabajos experimentales fueron realizados con los nutrientes Fe y Zn donde se observa un aumento de la concentración de estos elementos en granos de distintas variedades de maíz (Oikeh et al., 2003). Posteriormente, Hass et al. (2005), comprobó como incrementando el contenido en Fe en arroz a través de la fertilización, aumentaba la cantidad de este elemento en el plasma sanguíneo de las mujeres en Filipinas, reduciéndose así los casos de anemias en las mismas. A partir de estos trabajos y hasta la actualidad se ha ido publicando distintas investigaciones en las que se comprueba que la biofortificación es eficiente para elementos traza como el Fe, Zn, Se e I (Poletti et al., 2004), realizándose la mayoría de los trabajos en cereal puesto que son la principal fuente de alimentación de muchos países (Stein et al., 2006; Zhao et al., 2007; Yang et al., 2007; Ortiz-Monasterio et al., 2007; Zhu et al., 2007, Li et al., 2007; Díaz de la Garza et al., 2007; Cakmak, 2008; Mayer et al., 2008). En definitiva todos estos trabajos concluyen indicando la viabilidad del proceso, y mostrando el incremento de los diferentes nutrientes en las plantas estudiadas, sin embargo algunos también sugieren la importancia de mejorar el transporte por el floema de estos elementos, la variabilidad genética de las plantas cultivadas y la posible modificación genética con el fin de mejorar aún más la eficacia de los programas de biofortificación (Velu et al., 2007).

Por último, tenemos que tener en cuenta, que la eficiencia de cualquier mejora agrícola, y en este caso de la biofortificación, depende de la aceptación que tenga el producto en los consumidores. Teniendo en cuenta la mala reputación que tienen los productos obtenidos mediante modificación genética, la biofortificación se presenta como un producto potencialmente aceptado por la población (Nestel et al., 2006), así, solo quedaría informar al consumidor y poner en el mercado una amplia variedad de vegetales, con el fin de una buena aceptación por parte de la población mundial.

1.1.2. ¿Por qué es necesario un programa de biofortificación con Se en plantas?

Actualmente, al Se se le considera un elemento traza esencial para los animales tanto por su valor nutricional como clínico. Su función biológica en animales se ejerce a través de las llamadas selenoproteínas, con especial relevancia de la glutathion peroxidasa cuya función consiste en la destrucción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que se forma durante las reacciones respiratorias. Sin la actuación de estas proteínas, las células musculares, pancreáticas y hepáticas, por citar algunas, morirían rápidamente (Sies et al., 1972). El Se se presenta en la glutathion peroxidasa como un residuo de selenocisteína siendo el responsable de la eficiencia catalítica de dicha enzima (Aumann et al., 1997). La protección contra el daño oxidativo por parte de esta selenoproteína ha hecho que el Se se defina como un quimioprotector frente a la aparición de distintos tipos de cáncer. Como describiremos posteriormente, se ha comprobado que las células que se nutren adecuadamente con Se son menos susceptibles a los efectos dañinos de los radicales de oxígeno que pueden atacar al ADN causando mutaciones y producir la activación oxidativa de los cancerígenos químicos o virales (Köhrle et al., 2000). El Se también actúa, tanto en animales como en humanos, como un potente antioxidante, es eficaz en la inhibición de la expresión de ciertos virus (v.g. VIH) y tiene un papel importante en el funcionamiento óptimo del sistema inmune. Diversos estudios clínicos han demostrado que tanto las concentraciones de Se como las de glutathion peroxidasa están reducidas en pacientes que presentan la enfermedad de Alzheimer, así como en enfermos con diabetes y aquellos que padecen enfermedades cardiovasculares (Tapiero et al., 2003).

Además de todas estas funciones que acabamos de citar, en la actualidad al Se también se le atribuye un papel de especial relevancia por su capacidad en la prevención del cáncer. Esta función está abalada por distintos estudios recientes (Ip, 1998; Combs y Gray, 1998; Gauthier, 1999). Por ejemplo, los trabajos experimentales con animales demostraron que el aporte de Se en la dieta, fundamentalmente bajo su forma orgánica de origen vegetal, supone un

efecto preventivo muy eficaz del cáncer inducido por diversos agentes químicos (Ip et al., 1992; Ip y Lisk, 1995; Ip et al., 1996; Finley et al., 2001). El efecto del Se como un agente quimio protector se ha demostrado también con sujetos humanos, encontrándose que este elemento traza reduce la aparición de ciertos tipos de cáncer, como el de mama, próstata y colon (Köhrle et al., 2000). Además, se sabe que las personas que tienen concentraciones de Se en sangre inferiores a 0.2 mg/ml poseen un mayor riesgo de padecer los tipos de cáncer que acabamos de citar (Clark et al., 1993; Tapiero et al., 2003).

Aunque actualmente no se conoce de manera exacta cuáles son los mecanismos por los que el Se actúa en la inhibición o retraso de la carcinogénesis, lo que sí parece claro es que sus formas metiladas (v.g. metilselenio, dimetilselenio y trimetilselenio) son las más eficaces para la protección contra el cáncer (Vadhanavikit et al., 1993; Ganther y Lawrence, 1997). En este sentido su ingesta en forma orgánica de origen vegetal, principalmente como seleniometionina y metilseleniocisteína, es la más eficaz para incrementar los niveles de metabolitos metilados de Se (Jiang et al., 1999; Ip et al., 2000). Investigaciones realizadas con humanos han demostrado que las formas orgánicas, en comparación con las inorgánicas, son también mejor absorbidas y asimiladas (Butler et al., 1991; Moser-Veillon et al., 1992). Estos resultados nos permiten concluir que ya que las formas más abundantes de Se en las plantas son fundamentalmente orgánicas (seleniometionina y metilseleniocisteína; véase en *Imagen 1.2*), la ingesta de este elemento a través de los productos agrícolas, como frutos y verduras, será más efectiva en la prevención del cáncer, en comparación con su ingesta bajo sus formas inorgánicas. Esta conclusión está respaldada experimentalmente por estudios como el de Finley et al. (2001). Estos investigadores demostraron que las ratas que consumían 3 µg/g de plantas de brócoli fertilizadas con Se, en comparación con la ingesta en su forma inorgánica, producía un aumento significativo de la actividad glutatión peroxidasa, así como una reducción también significativa de la aparición de tumores.

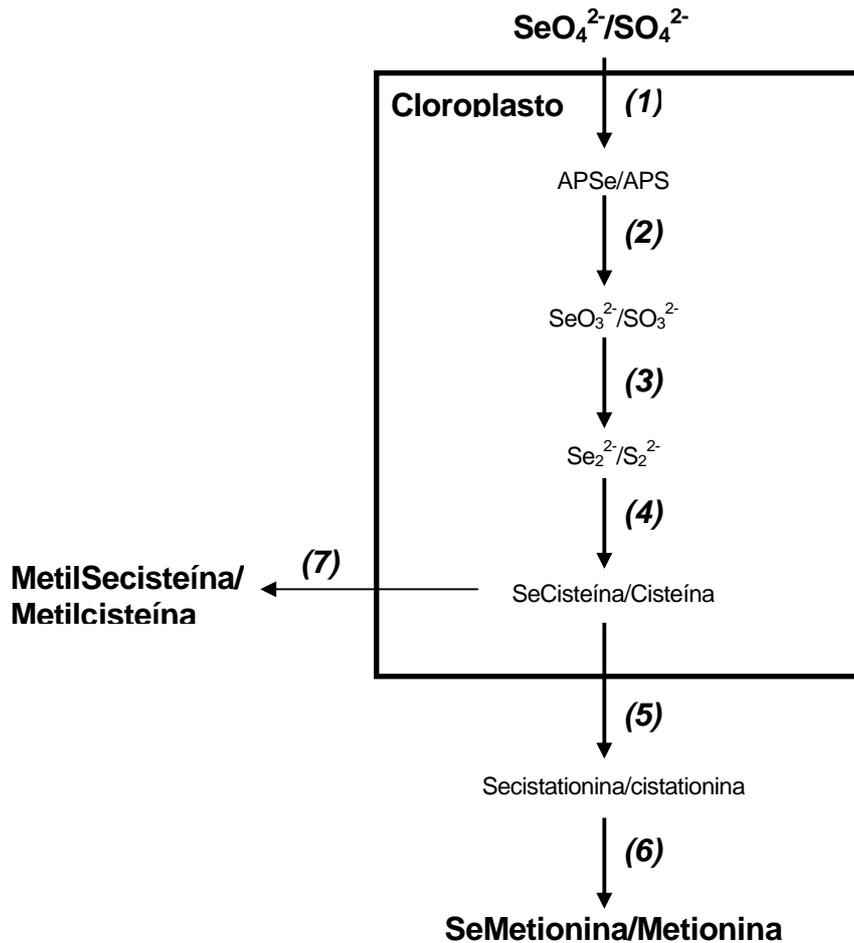


Imagen 1.2: Esquema de la asimilación del Se en las plantas. 1: ATP sulfurilasa; 2: APS reductasa; 3: Sulfito reductasa; 4: Complejo cisteína sintasa (SAT-OAS-TL); 5: Cistationina sintasa; 6: Metionina sintasa; 7: Metiltransferasa.

En resumen podemos proponer que la toma de Se en la dieta procedente de productos vegetales (forma orgánica) es el método más eficaz para obtener este elemento, ya que su biodisponibilidad es máxima. Por tanto, su eficacia para actuar como quimioprotector, tanto del punto de vista preventivo como curativo, dependerá no sólo de la cantidad ingerida sino también de la forma presente en la dieta (Köhrle et al., 2000; Tapiero et al., 2003).

En general, la cantidad de Se en nuestra dieta depende en gran medida de su concentración en el suelo, ya que esta concentración es la responsable final del contenido de Se en los alimentos que diariamente consumimos. Así, se ha encontrado que la concentración de Se en plantas y animales es directamente proporcional a la concentración en suelo (Girling, 1984). Muchas zonas del

mundo, entre las que se incluye la mayor parte de Europa, tienen poca concentración de Se en suelo, lo que hace que sus productos agrícolas destinados al consumo humano y animal sean también pobres en Se. Por ejemplo, hay estudios que demuestran que en países como Alemania, Noruega, Finlandia y Austria la concentración de Se en el suelo suele ser inferior a 0.3 mg/Kg, (Stadlober et al., 2001). Esta pobreza de selenio conlleva a que sus habitantes consuman una cantidad de Se entre 20 a 35 µg por día, cantidad bastante alejada de la que aconseja la Organización Mundial de la Salud (entre 50 y 200 µg por día). Para solucionar el problema de deficiencia de Se en la dieta, las autoridades finlandesas han aprobado el uso de fertilizantes de Se en la agricultura (principalmente como selenato sódico), lo que ha producido un aumento de Se en los productos agrícolas. Por ejemplo, en tubérculos de patata se ha pasado de una concentración inferior a 0.010 ppm a valores superiores a 0.070 ppm. Este aumento ha reinvertido positivamente en los niveles de selenio en sangre en la población humana. Concretamente de 1.05 a 1.70 µmol de Se/L (Eurola et al., 1989; Makela et al., 1993).

En relación con este tema, España se puede definir como una zona pobre en Se, con especial deficiencia en regiones como Galicia y Aragón. Otras zonas deficientes son las partes de Andalucía en las que se practica una agricultura intensiva, principalmente en el sector hortícola. Particularmente, en la provincia de Granada, Díaz-Alarcón et al. (1996) encontraron que la concentración media de Selenio varía entre 0.08 y 0.21 mg/Kg de suelo. Nuestro grupo de investigación ha demostrado también que en la vega de Granada los niveles de Se son inferiores a 0.2 mg/kg de suelo, lo que conlleva a que las plantas que se cultivan en esta zona presenten deficiencias de este elemento traza. Por ejemplo, en hojas de col china los valores son inferiores a 605 µg/kg de peso seco, y en tubérculos de patata menores que 100 µg/kg de peso seco (Moreno et al., 2000; Baghour et al., 2001). Teniendo en cuenta la importancia agrícola de la provincia de Granada, tanto en sus zonas costeras como de interior, la ingesta de frutos y hortalizas procedentes de estas zonas pueden no administrar a un ingente número de personas los niveles de Se recomendados por día en la dieta.

Como ya hemos comentado, una solución para aumentar los niveles de Se en la dieta consiste en fertilizar el suelo cultivable con sales de selenio (programa de biofortificación). Las dos formas más utilizadas son el Selenato y el Selenito sódico debido a que las plantas los absorben con mayor facilidad que otras formas de Se como las orgánicas (selenocisteína y selenometionina mucho menos disponible para las plantas) (Terry et al., 2000). Aunque el selenato sódico es la forma más utilizada, se piensa que el selenito sódico es más eficaz puesto que su asimilación a compuestos orgánicos de Se en la planta suele ser mayor (Terry et al. 2000).

Aunque un adecuado nivel de Se en el suelo es aconsejable por su repercusión en los niveles de este elemento en la planta, no debemos olvidar que una excesiva aplicación puede conducir, como se ha demostrado en algunos países como Finlandia y Austria, a la aparición de toxicidad en el suelo, y por tanto a una disminución de la productividad de los cultivos, así como a problemas de naturaleza medio-ambiental (Makela et al., 1995). Para evitar estos problemas es recomendable realizar experimentos previos en condiciones controladas de cámara de cultivo. Por esta razón en este trabajo de Tesis Doctoral hemos evaluado tanto la eficacia de los fertilizantes inorgánicos de Se (selenato vs. selenito), así como las dosis óptimas de los mismos que permitan las mayores concentraciones de Se orgánico en las plantas, sin que ello conlleve a una reducción de la productividad del cultivo ni a la aparición de fitotoxicidad.

1.2. Objetivos

Actualmente, al selenio (Se) se le considera un elemento traza esencial para los animales tanto por su valor nutricional como clínico. En relación a este último aspecto, al Se se le atribuye un papel de especial relevancia por su capacidad en la prevención del cáncer. Los trabajos experimentales con animales de I_p y sus colaboradores demostraron que el aporte de Se en la dieta, fundamentalmente bajo su forma orgánica de origen vegetal, supone un efecto preventivo muy eficaz del cáncer inducido por diversos agentes químicos (I_p et al., 1992; I_p y Lisk, 1995; I_p et al., 1996; Finley et al., 2001). El efecto del Se como un agente quimioprotector se ha demostrado también con sujetos humanos, encontrándose que este elemento traza reduce la aparición de ciertos tipos de cáncer, como el de mama, próstata y colon (Köhrle et al., 2000).

Además de estas investigaciones, distintos estudios han demostrado que la eficacia del Se para actuar como quimioprotector, tanto desde el punto de vista preventivo como curativo, depende no solo de la cantidad ingerida sino también de la forma presente en la dieta. Trabajos como los de Blutler et al. (1991); Moser-Veillon et al. (1992) y Finley et al. (2001) han encontrado que la ingesta de este elemento a través de los productos agrícolas, como frutos y verduras, es más efectiva en la prevención del cáncer, en comparación con su ingesta bajo sus formas inorgánicas. En general se ha comprobado que la cantidad de Se en nuestra dieta depende en gran medida de su concentración en el suelo, ya que esta concentración es la responsable final del contenido de Se en los alimentos que diariamente consumimos. Sin embargo, muchas zonas del mundo, incluida España, presentan muy bajas concentraciones de Se en el suelo. Por lo que para aumentar las concentraciones de Se en productos vegetales destinados al consumo humano una solución es la utilización de fertilizantes de Se en la agricultura (biofortificación con Se), como han llevado a cabo varios países del centro de Europa. En este trabajo como fertilizantes de Se utilizaremos las dos formas inorgánicas más fácilmente accesibles para la plantas como son el selenito y selenato. Bajo condiciones controladas analizaremos en esta Tesis Doctoral la

eficacia de cada fertilizante aplicado en diferentes dosis con el fin de evitar, como ha ocurrido en los países de Finlandia y Austria, la aparición de toxicidad en el suelo y por tanto una disminución de la productividad de los cultivos, así como problemas de naturaleza medio-ambiental derivados de la toxicidad de Se (Makela et al., 1995).

En definitiva, los objetivos de nuestro trabajo serán los siguientes:

- 1- Realizar un programa de biofortificación con Se en plantas de lechuga en donde determinaremos:
 - a) A que dosis y forma de Se (selenito vs selenato) se produce la mayor acumulación de este elemento traza en la parte comestible destinada al consumo humano sin que para ello se produzca una reducción de la producción del cultivo de lechuga.
 - b) El efecto sobre la calidad nutricional del producto agrícola centrándonos principalmente en la capacidad antioxidante debido al papel cada vez más importante que tienen las sustancias antioxidantes como protectoras frente a la exposición de agentes cancerígenos y mutagénicos.
- 2- Estudiar el efecto de un programa de biofortificación con Se con distintas dosis y formas de este elemento traza sobre alguno de los procesos fisiológicos en las plantas y sobre el estado nutricional de estas, aspectos éstos esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas.

Capítulo 2
Biofortificación con Se e
inducción de la capacidad
antioxidante

2.1. Introducción

El Selenio (Se) ha sido considerado un elemento esencial en la nutrición de los animales desde 1957, requiriendo los humanos una cantidad diaria de dicho nutriente de 50-70 $\mu\text{g día}^{-1}$ (U.S. Department of Agricultura, 2003). Ya que el Se es un componente de importantes enzimas como la glutatión peroxidasa, selenioproteína P y tetraiodotrína 5'-deiodinasa, las cuales participan en la protección antioxidante de las células animales (Combs y Gray, 1998; Ellis y Salt, 2003). Además diferentes estudios muestran que una suplementación en este mineral en la dieta humana disminuye la incidencia de algunos tipos de cáncer, como el cáncer de próstata y pulmón (Clark et al., 1996; Ip y Ganther, 1992; Ip et al., 1991; Lauchli, 1993). En este sentido, Ip et al. (1991) confirmaron en estudios experimentales con animales que la suplementación con Se en la dieta y fundamentalmente bajo su forma orgánica de origen vegetal, como metilselenocisteína y metilselenometionina (Combs et al., 1997; Roser et al.; 1999), previenen cánceres inducidos por diversos agentes químicos (Ip et al., 1992; Ip and Lisk, 1995; Ip et al., 1996). Otros trabajos indican un posible efecto del Se sobre el sistema inmunitario en humanos, fortaleciendo la resistencia a infecciones virales como la del VIH (Broome et al., 2002; Arthur, 2003). Además, su esencialidad en los humanos también ha sido demostrada por su papel en el correcto funcionamiento del metabolismo de Yodo en el tiroides y optimización de la función biológica del Hierro y Cinc (Lyons et al., 2004).

La importancia del selenio en la nutrición de mamíferos es primordial, ya que la deficiencia de Se puede promover la aparición de cáncer (Diwadkar-Navsariwala et al., 2006). Una dieta deficiente en este elemento en los humanos es normalmente debida a una ingestión de vegetales destinados al consumo humano con una concentración imperceptible de Se, debido a su baja biodisponibilidad en la mayoría de los suelos agrícolas (Smorklji et al., 2005; Pedrero et al., 2006), especialmente en distintas zonas del mundo como son: China, UK, Este de Europa, Africa y Australia (Chen et al., 2002; Lyons et al.,

2005). Por consiguiente, dada esta baja biodisponibilidad y el papel de los vegetales como principal fuente de este elemento en la dieta, muchos trabajos están apareciendo en estos últimos años respecto a las vías para incrementar el contenido en Se en las plantas destinadas al consumo humano.

La biofortificación ha sido definida como el proceso de incrementar la concentración biodisponible de elementos esenciales en la parte comestible de las plantas cultivadas mediante intervención agronómica o selección genética (White y Broadley, 2005). En este sentido, han aparecido recientes trabajos, como los de Chen et al. (2002) en arroz, Lyons et al. (2005) en diferentes variedades de trigo, y recientemente Pedrero et al. (2006) en rábano, demuestran que una fertilización con Se incrementa el contenido de este elemento traza en las plantas y además muestran como este se traslada como aumento en el Se ingerido en humanos.

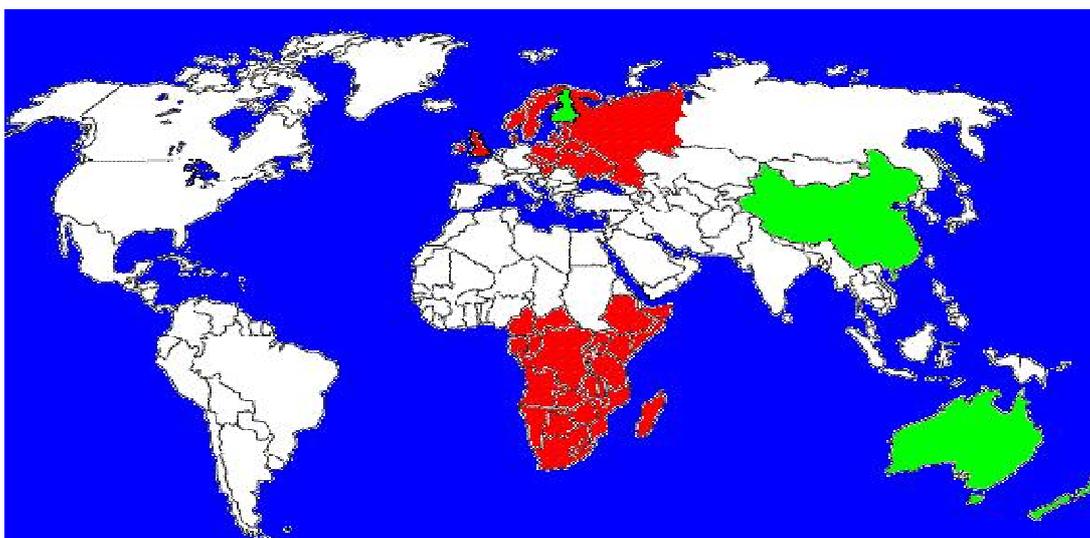


Imagen 2.1: Países del mundo con suelos muy deficientes en Se. En verde están representados los países donde se está llevando a cabo programas de biofortificación en prueba.

A pesar de la garantía ofrecida por estos resultados, y por los programas de biofortificación realizados en diferentes países como Finlandia, Australia y Nueva Zelanda, donde la ingestión de plantas sujetas a una fertilización con Se reforzó la concentración en el plasma sanguíneo de este elemento traza en

humanos y animales (Arthur, 2003), pocos estudios han comparado la efectividad de estos programas de biofortificación entre las dos formas de Se inorgánico (selenito vs. selenato) que son más disponibles y fácilmente absorbidos por las plantas (Ximénez-Embín et al., 2004). Tampoco existen muchos trabajos que analicen el Se sobre la calidad nutricional de las plantas usadas para el consumo humano, particularmente sobre la capacidad antioxidante, cuando existen evidencias que una aplicación excesiva de Se puede tener efectos fitotóxico sobre las plantas (Hartikainen et al., 2000) y así afectar a sus características nutricionales. El estudio de la capacidad antioxidante en la parte comestible de las plantas es realmente importante, ya que en la última década se ha demostrado que la ingestión de antioxidantes de origen vegetal pueden neutralizar la aparición de especies de oxígeno reactivas (ROS), y así disminuir la aparición de algunas enfermedades como el cáncer y enfermedades neurodegenerativas (Tudela et al., 2002).

Un trabajo reciente donde se examinan estos aspectos es el realizado por Cartes et al. (2005). En este trabajo los autores sugieren que el Se induce la capacidad antioxidante por estar relacionado con la actividad de la glutatión peroxidasa ya que la actividad de esta enzima se intensifica con el incremento en la concentración foliar de este elemento. En trabajos previos, el Se ha sido definido como un inductor de la capacidad antioxidante en plantas, incrementando algunos compuestos como el tocoferol, y los compuestos fenólicos (Lee et al., 2001; Hartikainen et al., 2000; Xu et al., 2003). Sin embargo en la actualidad no se conoce con exactitud como la aplicación de diferentes dosis y formas de Se pueden afectar a la capacidad antioxidante en plantas.

En resumen, dada la importancia y los beneficios de la biofortificación con Se, en este capítulo, no sólo se compara el efecto de la aplicación de Se bajo distintas formas (selenito vs selenato), sino también que dosis resultaría la más conveniente en un futuro programa de biofortificación con Se en plantas de lechuga, con el fin de conseguir la máxima capacidad antioxidante y acumulación de Se sin provocar una pérdida de biomasa foliar, y por tanto de producción.

2.2. Material y Métodos

2.2.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento

El material vegetal utilizado en los experimentos que constituyen este trabajo de Tesis Doctoral ha sido la lechuga (*Lactuca sativa* cv Philipus).

La lechuga, cuyo nombre científico es *Lactuca sativa* L., perteneciente a la Familia *Astraceae*; se caracteriza por ser plantas anuales o bianuales, de porte recto y hasta 1 m de altura, lampiñas y con tallos ramificados. Hojas basales arrosetadas, obovadas y dentado-crenadas (Sanchez-Monge, 1991). Es ampliamente conocida y cultivada en todo el mundo, a través de numerosos tipos y variedades, siendo la planta más importante entre las hortalizas de hojas que se consumen crudas (Giaconi, 1995).

Lactuca sativa L. var. longifolia o philipus, corresponde a las lechugas llamadas romanas. La planta desarrolla hojas grandes, erguidas, oblongas y obovadas, de 20 a 30 cm de largo y 6 a 10 cm de ancho, con nervadura prominente, superficie ligeramente ondulada y borde irregularmente dentado, con nerviatura central muy ancha. El tallo se presenta de mayor longitud que en las variedades anteriores y permanece protegido por el conjunto de hojas, las que forman una cabeza cónica o cilíndrica (Sanchez-Monge, 1991).



Imagen 2.2: *Lactuca sativa* L. var. longifolia o philipus

La lechuga tiene una gran importancia en la dieta de los humanos siendo una de las plantas más consumidas en fresco en ensaladas del mundo (Deshpande y Salunkhe, 1998). Por su valor nutricional, debemos destacar que es un vegetal muy poco calórico, pero que aporta gran cantidad de nutrientes esenciales. A continuación, en la Tabla 1.1 se muestra su calidad nutricional (Gebhardt y Tomas, 2002).

Lechuga	100gr
Agua	95%
Calorías	18gr
Proteínas	2gr
Grasas	-
Colesterol	-
Hidratos de Carbono	4gr
Ca	52mg
Fe	0,5mg
K	419mg
Na	8mg
Vitamina A	1,58 International Unit
Tiamina	0,10mg
Riboflavina	0,10mg
Niacina	0,5mg
Vitamina C	13mg

Tabla 1.1 Valor nutricional de la lechuga, obtenido por cada 100gr de lechuga

La elección de esta planta para un programa de biofortificación con Se se debe básicamente a 2 razones:

- 1- Al ser su parte comestible la hoja la concentración de Se en este grano será directamente proporcional a la cantidad aplicada de este elemento traza en el medio de cultivo lo que nos permitirá por su lado la posibilidad de que el programa de biofortificación de Se se realice con éxito, y por lo lado nos permitirá estudiar el efecto de la acumulación de Se sobre distintos procesos fisiológicos y nutricionales.
- 2- Este vegetal es uno de los más cultivados en el mundo, teniendo una producción mundial de 23.131.432 toneladas al año, siendo España uno de los principales productores mundiales con 1.069.500 toneladas, y

sólo superada por China con 11.605.250 toneladas y Estados Unidos con 4.659.460 toneladas en el año 2006 (FAO, 2006).

Las plantas de *Lactuca sativa* L. cv Philipus fueron germinada y crecieron durante 35 días en un semillero del sur de España (Granada, Motril, Saliplant S.L.). A los 35 días después de la germinación las plantas fueron transplantadas a una cámara de cultivo del Departamento de Fisiología Vegetal del la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, bajo condiciones ambientales controladas (humedad relativa del 60-80%, temperatura 22/18°C (día/noche) y un fotoperiodo de 12/12 horas a un PPFd de 350 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ medido por encima de las plantas con un sensor 190 SB, LI-COR Inc., Lincoln, NE, USA).

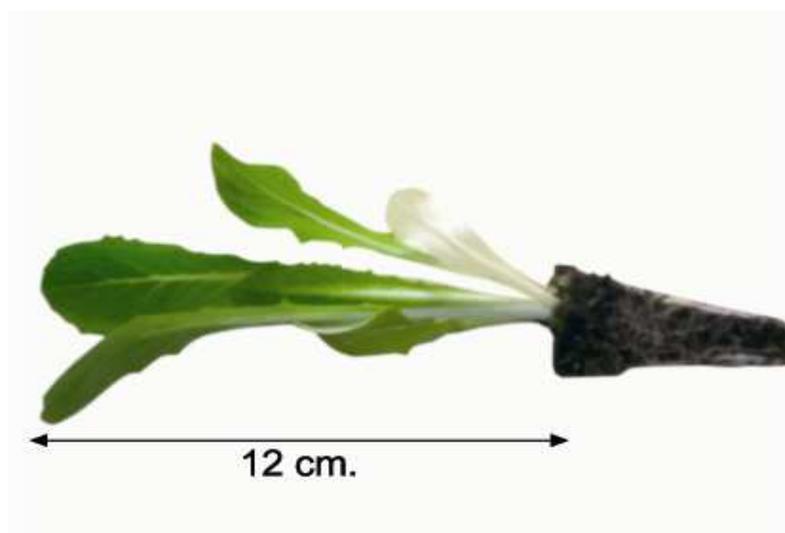


Imagen 2.3: Tamaño lechuga en el momento del transplante a la cámara de cultivo.

Las plantas crecieron en maceteros individuales (25 cm diámetro superior, 17 cm diámetro menor, 25 cm de altura) de 8 L de volumen, rellenos con vermiculita. Hasta el final del experimento las plantas recibieron una solución nutritiva la cual estuvo compuesta por: 4 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 6 mM KNO_3 , 2 mM $\text{MgSO}_4 + 7 \text{H}_2\text{O}$, 1 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$, 50 μM H_3BO_3 , 2 μM $\text{MnCl}_2 + 4 \text{H}_2\text{O}$, 1 μM $\text{ZnSO}_4 + 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,1 μM $\text{Na}_2\text{MoO}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,25 μM $\text{CuSO}_4 + 5 \text{H}_2\text{O}$, 10 μM Fe-EDDHA. La solución nutritiva tuvo un pH 5,5-6,0 y fue

renovada cada tres días, la vermiculita se lavó con agua destilada con el fin de evitar la acumulación de nutrientes.



Imagen 2.4: Cultivo de lechuga, en cámara de cultivo bajo condiciones controladas

A los 45 días después de la germinación, los diferentes tratamientos fueron aplicados junto a la solución nutritiva descrita anteriormente. Los tratamientos mantenidos durante 21 días, consistieron en diferentes dosis de selenato sódico (5, 10, 20, 40, 60, 80, 120 $\mu\text{mol L}^{-1}$ como Na_2SeO_4) y selenito sódico (5, 10, 20, 40, 60, 80, 120 $\mu\text{mol L}^{-1}$ como Na_2SeO_3). Además se realizó un tratamiento control que consistió en la aplicación solo de la solución nutritiva descrita anteriormente.

El diseño experimental fue totalmente aleatorio, consistente en 15 tratamientos, repetidos 3 veces con 6 plantas en cada repetición. La experiencia se repitió tres veces bajo las mismas condiciones de cultivo ($n=9$).

2.2.2. Muestras vegetales

Las hojas de las planta fueron muestreadas transcurridos 66 días después de la germinación. Las muestras foliares fueron estandarizadas mediante el uso de hojas totalmente expandidas de la parte media de las plantas en todas las replicaciones, pues en estas hojas es donde se refleja más claramente el

estado nutricional y metabólico, y por tanto el efecto de los tratamientos aplicados. El material fue lavado tres veces con agua destilada después de su descontaminación con un detergente no iónico al 1 % y se secaron en papel de filtro.

Una parte de las hojas muestreadas fue usada en fresco para el análisis de la peroxidación de lípidos [actividad lipo-oxigenasa (LOX) y contenido en malondialdehído (MDA)], oxidación de proteínas (grupos carbonilos), fenoles totales, flavonoides, phenilpropanoides glicósidos (PPGs), ascorbato y los test de capacidad antioxidante FRAP (the Ferric Reducing Ability of Plasma), DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) y Poder Reductor.

Otra parte de la muestra fue secada mediante liofilización y el peso fue registrado y expresado como gramos de peso seco (p.s.) [parte aérea]⁻¹ (p.a.), y se utilizó para determinar la concentración en Se total.

2.2.3. Análisis vegetal

2.2.3.1. *Medida de la peroxidación de lípidos*

Para el ensayo del MDA, 0,5 g de hoja de lechuga fueron homogeneizados en 5 ml de una solución de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0.25% en ácido tricloroacético (TCA) al 10%. La mezcla fue calentada a 95°C durante 30 min. y a continuación se enfrió en un baño de hielo. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 9500 rpm durante 10 min. y se cuantificó el contenido en MDA en el sobrenadante a A₅₃₂. También se obtuvo el valor de absorbancia no específica a A₆₀₀ para corregir la turbidez. La concentración de MDA fue calculada usando como coeficiente de extinción 155 mM⁻¹ cm⁻¹ (Fu y Huang, 2001).

La actividad LOX (EC 1.13.11.12) fue medida de acuerdo con Mínguez-Mosquera et al. (1993), usando tampón KH₂PO₄-K₂HPO₄, 50 mM a pH 6, el cual contenía polivinylpolypyrrolone (PVPP) al 1% para la extracción de la enzima. Posteriormente el homogeneizado fue centrifugado a 9500 rpm

durante 20 min. El extracto enzimático se mezcló con 0,5 mM de ácido linoleico en tampón $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$, 50 mM a pH 6 y tween 20 al 0.1%. La actividad LOX fue calculada mediante la diferencia de absorbancia a 234 nm usando un coeficiente de extinción de $25000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. La cantidad de proteínas del extracto enzimático fueron determinadas mediante el método de Bradford (1976), usando una curva patrón de BSA.

2.2.3.2 *Determinación de Grupos Carbonilos*

Para la determinación del contenido en grupos carbonilos; 0,5 mg de hoja de lechuga fueron homogeneizados con 10 ml de $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ 100 mM (pH 7), el cual contenía 0,1% de Tritón X100, 1 mM de Na- EDTA y 0,1 mM de fenilmetanosulfonil fluoruro (PMSF), y el homogenado posteriormente fue centrifugado a 15800 rpm durante 20 min. a 4°C. Seguidamente, se tomó del sobrenadante 1 ml al que se le añadió 0,2 ml de 2,4 dinitrophenylhydrazine (DNPH) 20 mM, disuelto en HCl 2M. Además, se hicieron unos tubos control, consistentes en 1 ml del sobrenadante al que se le adicionó 0.2 ml de HCl 2M. La mezcla de reacción se dejó incubar durante una hora a 25 °C, agitándose cada 15 min. en un vortex. Pasada la hora de incubación se añadió 1 ml de ácido tricloroacético al 20% a todos los tubos y se centrifugaron a 11500 rpm durante 3 min. El sobrenadante obtenido, se desechó, y el pellet fue lavado dos veces con 1 ml de etanol-etileter. Posteriormente, se añadió 1 ml de guanidina-HCl 6M a pH 4,5, donde se resuspendió el pellet, y se dejó incubar durante 30 min. a 37°C y tras la incubación se procedió a centrifugar los tubos a 11500 rpm durante 3 min. Finalmente los grupos carbonilos fueron medidos cuantitativamente a una absorbancia de 370 nm de acuerdo con el método de Moran et al. (1994). Los resultados obtenidos fueron expresados como mmol de grupos carbonilos g^{-1} de peso fresco (p.f.).

2.2.3.3. *Determinación de fenoles totales*

Los fenoles totales del tejido vegetal fueron extraídos con metanol, cloroformo y solución salina al 1%, mediante homogenización. Posteriormente el homogeneizado fue filtrado y centrifugado a 5000 rpm durante 10 min. De la

fase metabólica se tomó una alícuota de 0,5 ml a la que se le añadió 1,5 ml de Na_2CO_3 al 2%, 0,5 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu al 50 % y 2,75 ml de agua destilada. La mezcla de reacción se incubó durante 60 min. a temperatura ambiente (Rivero et al., 2001). El contenido se cuantificó a una absorbancia de 765 nm. Los resultados obtenidos fueron expresados como μg de ácido cafeico g^{-1} p.f.

2.2.3.4. *Determinación de flavonoides*

El contenido en flavonoides fue medido mediante método colorimétrico de Kim et al. (2003). Tras una homogenización con el mismo extractante que el usado para los fenoles, se tomaron 0,5 ml de alícuota a la que se le añadió 2 ml de agua destilada y 0,15 ml de NaNO_2 al 5%. A continuación se incubaron las muestras durante 5 min. a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido este tiempo se añadió 0,15 ml de una solución de $\text{AlCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ al 10% y 1 ml de una solución de 1 M NaOH. La mezcla de reacción fue bien agitada e incubada a temperatura ambiente y en oscuridad durante 15 min. La absorbancia se midió a 415 nm y el contenido de flavonoides fue calculado usando una curva patrón de rutín. Los datos fueron expresados como μg rutín g^{-1} p.f.

2.2.3.5. *Determinación del ascorbato total*

El ascorbato total fue determinado espectrofotométricamente siguiendo el método usado por Gossett et al. (1994). Hojas de lechuga (1g p.f.) fueron homogenizadas en 10 ml de ácido m-fosfórico 5% (p/v) frío. El homogeneizado fue centrifugado a 13500 rpm durante 15 min. Para la determinación del ascorbato total 100 μl del sobrenadante fue incubado a 25 °C durante 10 min. en oscuridad con una mezcla de reacción formada por 0,5 ml de 150 mM KH_2PO_4 , y 0,1 ml de DTT (dithiothreitol) 10 mM. Tras la incubación, se añadió 100 μl de 0,5% (w/v) n-etilmaleimida. El color apareció tras la adición de 400 μl 10% (p/v) de ácido tricloroacético, 400 μl de ácido o-fosforico al 44%, 400 μl de 6,5 mM á - á -1 -dipiridil en etanol al 70%, y 200 μl de 110 mM FeCl_3 . La mezcla de reacción fue incubada a 40°C durante 40 min. y finalmente la

absorbancia fue anotada a A_{525} . Frente a una curva patrón de ascorbato sódico, con la cual se siguió la misma metodología que con las muestras.

2.2.3.6. *Determinación de PPGs totales*

La determinación de PPGs fue realizada de acuerdo a el método colorimétrico basado en la estimación de derivados del *o*-dihidroxicinámico por la reacción de Arnow (Arnow, 1937). Tras una extracción con metanol (similar a la de los fenoles totales), a 1 ml de sobrenadante (fase metabólica) de cada una de las muestras se le añadió 2 ml de HCl 0,5 M, 2 ml de una solución de NaNO_3 al 10% y $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ al 10% (reactivo de Arnow), fanalmente se le adicionó 2 ml de 2 M NaOH. La solución fue llevada hasta 10 ml con agua destilada. Después de 10 min., la absorbancia fue medida a A_{525} , frente a una curva patrón, realizada con una solución madre de 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-L-alanina (Gálvez et al., 2005).

2.2.3.7. *Ensayo FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma)*

El test FRAP, es considerado uno de los test más rápidos y usados para determinar la actividad antioxidante (Rice-Evans, 2000). Está basado en la reducción del complejo amarillo Fe^{3+} -TPTZ a un complejo de color azul, Fe^{2+} -TPTZ, por sustancias donadoras de electrones bajo condiciones ácidas. El ensayo fue realizado con el reactivo FRAP, compuesto de 1 mM 2,4,6-tripirildil-2-triazina (TPTZ) y 20 mM FeCl_3 en 0,25 M CH_3COONa , pH 3,6. Un extracto de 100 μl , obtenido de la homogenización de 1 g p.f. en 10 ml de metanol, y posteriormente filtrado y centrifugado a 10200 rpm durante 2 min; fue añadido a 2 ml de reactivo FRAP. Posteriormente la mezcla fue incubada a temperatura ambiente (20°C) durante 5 min. La absorbancia fue medida a A_{593} frente a una curva patrón de 25–1600 μM Fe^{3+} preparada usando una solución madre 25 mM de sulfato ferroso (Benzie y Strain, 1996).

2.2.3.8. *Ensayo DPPH*

En el ensayo DPPH los antioxidantes reducen el radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidracil, el cual tiene un máximo de absorción a A_{515} . El test del radical libre DPPH fue realizado según Hsu et al. (2003). Se obtuvo un extracto metanólico (1 g/5 ml metanol 80%), el cual posteriormente fue filtrado y centrifugado a 6000 rpm durante 10 min. Del sobrenadante resultante se tomó 0,5 ml de extracto y se mezcló con 2,5 ml de una solución 0,1 mM de DPPH recién preparada, y la mezcla fue incubada durante 60 min. en oscuridad y frío. La absorbancia de la reacción fue medida por espectrofotometría a A_{517} . Para el blanco de las muestras se reemplazó el extracto por 0,5 ml de metanol. Los valores del Test DPPH se obtuvieron con la aplicación de la siguiente fórmula (Hsu et al., 2003).

$$\% = [1 - (A_{517} \text{muestras} / A_{517} \text{blanco})] \times 100 \text{ (Hsu et al., 2003).}$$

2.2.3.9. *Test del Poder Reductor*

El test del Poder Reductor, el cual está basado en la transición del Fe^{3+} a Fe^{2+} por la reducción del complejo ferricianida ferrica al complejo ferricianida ferrosa que posee color azul y sirve como un indicador significativo de la actividad antioxidante potencial de un extracto, medida como % de actividad equivalente de ácido ascórbico (1 mM) (Meir et al., 1995).

El poder reductor en extractos de hoja de la lechuga fue medido de acuerdo con el método descrito por Hsu y col. (2003). A 1 ml de extracto de lechuga, que se obtuvo macerando 1 g/5 ml metanol 80 %; se le añadió buffer fosfato (0,2 M, pH 6.6) y $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (1% v/w) y la mezcla fue incubada durante 20 min. a 50°C. Posteriormente los tubos fueron enfriados inmediatamente sumergiéndolos en hielo y entonces se les añadió 0,5 ml Cl_3CCOOH al 10%. A continuación, fueron centrifugados a 5000 rpm durante 10 min. y se tomó 1 ml del sobrenadante obtenido y se mezcló con 1 ml de agua destilada y 0,1 ml de FeCl_3 (0,1%), la mezcla se incubó durante 10 min. y la absorbancia fue medida a 700 nm.

2.2.3.10. *Determinación de Se total*

Para la determinación de la concentración de Se, 25 mg de muestra fueron digeridos con 2,5 ml HNO₃ concentrado y 1 ml de H₂O₂ en un baño de arena. La solución resultante fue diluida en 25 ml de agua destilada y la concentración del metal fue determinada por ICP:MS de acuerdo con Pedrero et al. (2006). La concentración en hojas fue expresada como mg Kg⁻¹ peso seco (p.s.).

2.2.4. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de la varianza (ANOVA) simple con un intervalo de confianza del 95% usando el programa Statgraphics 6.1. Por otro lado, para conocer si las dosis y formas de Se aplicada en el experimento afectaron de forma significativa a los resultados, se llevó a cabo una ANOVA de dos vías y las medias se compararon mediante el procedimiento de las menores diferencias significativas de Fisher (LSD, Lower Significant Difference). Los niveles de significación para ambos análisis fueron expresados como: * P< 0,05; ** P<0,01; *** P<0,001 y n.s: no significativo.

2.3. Resultados y Discusión

En las plantas, el estrés afecta negativamente a su crecimiento y desarrollo, y además produce ROS que dañan numerosas macromoléculas y estructuras celulares. Consecuentemente, bajo condiciones adversas, uno de los más fiables y extendido indicador de estrés para las plantas es la producción de biomasa. Además de la producción de biomasa existen otros indicadores que también son ampliamente empleados para detectar el nivel de estrés del vegetal como son: peroxidación de lípidos, expresado mediante la actividad de la LOX y el contenido en MDA; y el estado de oxidación de las proteínas determinado como el contenido en grupos carbonilo (Moran et al., 2002; Rosales et al., 2006). Nuestros resultados con respecto a la biomasa de la parte comestible de plantas de lechuga revelan diferencias significativas

dependiendo de la forma y la dosis de Se aplicadas ($P < 0,001$, Fig. 2.1), generalmente presentando se un mayor incremento cuando la forma aplicada fue selenato respecto al selenito (Fig. 2.1).

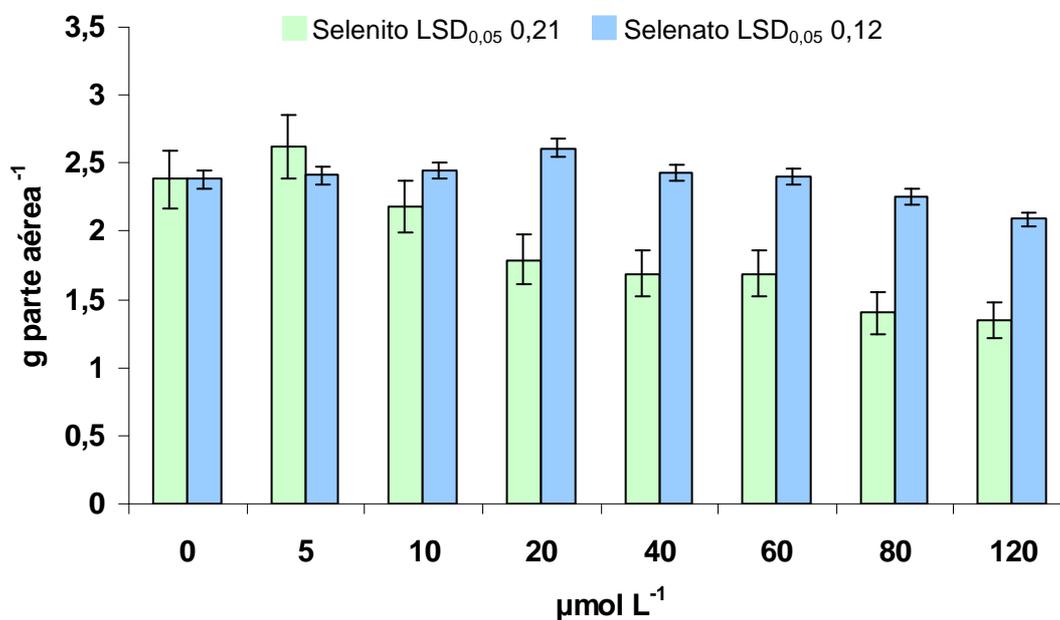


Figura 2.1 Biomasa aérea en plantas de *Lactuca sativa* L. sometidas a diferentes dosis y formas de Se. Los datos son medias \pm error estándar ($n=9$)

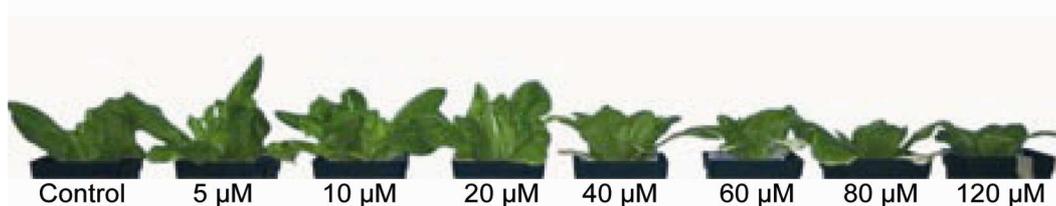


Imagen 2.5: Comparación del crecimiento de las lechugas sometidas a diferentes dosis de selenito

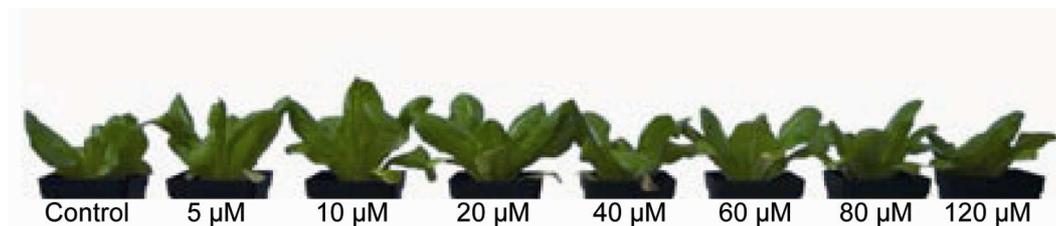


Imagen 2.6: Comparación del crecimiento de las lechugas sometidas a diferentes dosis de selenato

Los valores más elevados de biomasa aérea fueron registrados en la dosis de 20 μM en el caso del selenato y de 5 μM en el caso del selenito. A estas concentraciones observamos un crecimiento superior al de las plantas control (Fig. 2.1). Cuando la aplicación fue de 40 μM de selenato y 10 μM de selenito, no encontramos diferencias significativas con respecto a la biomasa aérea de las plantas control. A partir de estas dosis para ambas formas, el crecimiento de la planta fue disminuyendo progresivamente hasta la concentración de 120 μM , donde la producción en biomasa encontrada fue la menor para ambas formas de Se aplicadas (Fig. 2.1).

En general, los resultados nos indican que la forma en selenato es menos tóxica que el selenito, dado que las plantas toleran y responden positivamente, incluso induciéndose su crecimiento hasta la dosis de 40 μM de esta forma de Se, mientras que este efecto ocurre con el selenito, sólo hasta la concentración de 10 μM (Fig. 2.1).

Además de la biomasa, como hemos comentado anteriormente, existen otros indicadores en las plantas muy fiables de la existencia de un estrés. Encontramos que la aplicación externa de diferentes dosis de Se incremento la actividad LOX, la concentración foliar de MDA, y los grupos carbonilos, presentándose los máximos valores a concentraciones de 120 μM tanto de selenito como de selenato (Tabla 2.2).

Tabla 2.2 Efecto de la aplicación de diferentes dosis y formas de Se sobre la peroxidación de lípidos medidos como actividad LOX y contenido en MDA, y la oxidación de proteínas medida como contenido en grupos carbonilos. Los datos son medias \pm error estándar (n=9)

Tratamientos	LOX		MDA		Grupos Carbonilo	
	SeO ₃	SeO ₄	SeO ₃	SeO ₄	SeO ₃	SeO ₄
Dosis (μ M)						
0	0,21 \pm 0,03	0,21 \pm 0,03	6,88 \pm 0,13	6,88 \pm 0,13	109 \pm 4,72	109 \pm 4,72
5	0,30 \pm 0,03	0,22 \pm 0,02	7,51 \pm 0,17	7,16 \pm 0,19	104 \pm 4,32	90 \pm 4,92
10	0,32 \pm 0,04	0,26 \pm 0,03	8,03 \pm 0,16	7,26 \pm 0,25	128 \pm 5,66	98 \pm 4,77
20	0,35 \pm 0,03	0,30 \pm 0,03	8,97 \pm 0,22	7,34 \pm 0,20	115 \pm 4,87	108 \pm 5,91
40	0,36 \pm 0,02	0,33 \pm 0,02	9,49 \pm 0,20	7,55 \pm 0,22	119 \pm 5,18	125 \pm 5,72
60	0,38 \pm 0,03	0,34 \pm 0,04	10,7 \pm 0,19	7,98 \pm 0,27	159 \pm 5,56	113 \pm 6,15
80	0,38 \pm 0,04	0,35 \pm 0,05	11,0 \pm 0,27	8,05 \pm 0,31	171 \pm 6,01	137 \pm 6,04
120	0,42 \pm 0,05	0,37 \pm 0,04	11,9 \pm 0,25	8,12 \pm 0,29	178 \pm 6,43	157 \pm 5,87
P-valor	***	**	***	***	***	***
LSD	0,01	0,08	0,06	0,13	10,6	8,87
Análisis de la Varianza						
Formas Se (F)	***		***		***	
Dosis Se (D)	***		***		***	
FxD	n.s		***		***	
LSD	0,04		0,07		9,66	

Actividad LOX expresada como: $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg prot}^{-1}$. Contenido en MDA expresado como $\mu\text{mol g}^{-1}$ p.f. Contenido en grupos carbonilos expresados como: $\mu\text{mol g}^{-1}$ p.f.

Los niveles de significación están representados por: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, y n.s, no significativo.

En general, encontramos para estos parámetros que la aplicación del selenito siempre produjo valores más elevados que los encontrados cuando la forma añadida es selenato (Tabla 2.2). Nuestros resultados respecto a la concentración en MDA son similares a los encontrados por Hartikainen et al. (2000) y Xue et al. (2001), quienes observaron un incremento en este parámetro a medida que aumentaba la aplicación externa de Se. Por otro lado, nuestros datos coinciden con los obtenidos en otros trabajos como los de Lee et al. (1998) y Cartes et al. (2005), quienes indican que la aplicación de selenito incrementa de una forma más importante el contenido de MDA que cuando se aplica al medio de cultivo el selenato. Recientemente, Gomez-Junior et al.

(2007) encuentra en suspensiones celulares de café que la aplicación de selenito a bajas concentraciones (0,05 mM) producen una rápida peroxidación de lípidos.

Nuestros los resultados de los indicadores de toxicidad coinciden con la aparición de una disminución en la biomasa de las plantas (Fig. 2.1). De acuerdo con lo encontrado en nuestro experimento las aplicaciones de elevadas dosis de Se (80-120 μM) constituyen los tratamientos más fitotóxicos, siendo el selenito la forma de Se más fitotóxica en nuestro trabajo.

En los programas de biofortificación, la cantidad de Se acumulado en las plantas es muy importante ya que, y en especial para el Se, la ingesta de este elemento traza va a depender en gran medida de la cantidad que se presente en el vegetal. Los resultados muestran que la concentración de Se en la parte comestible de la lechuga depende de la dosis y forma de Se aplicado en el medio de cultivo ($P < 0,001$; Fig. 2.2).

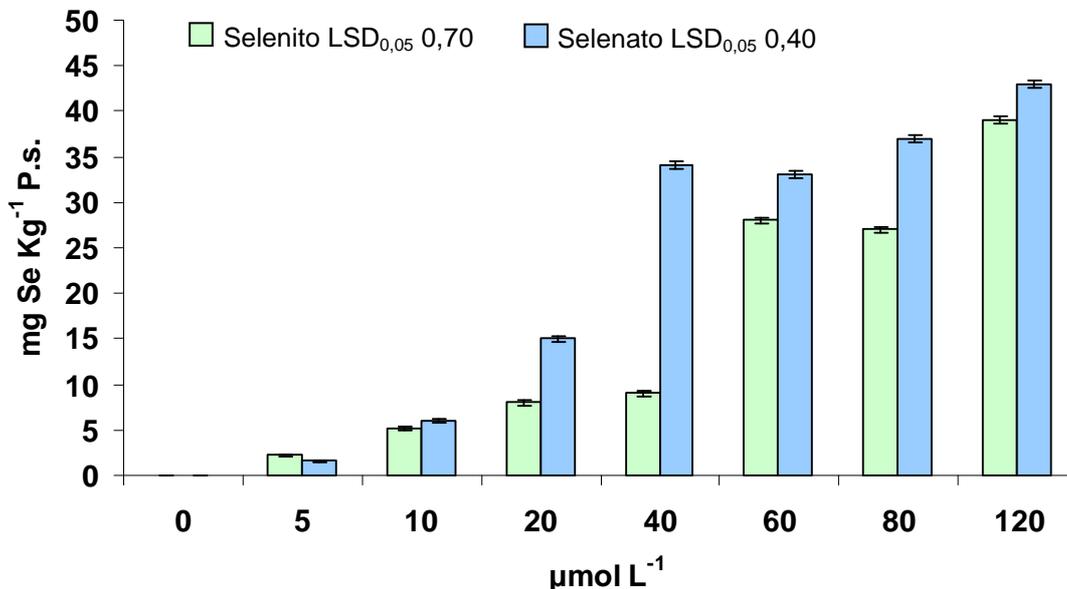


Figura 2.2 Concentración de Se en hojas de *Lactuca sativa* L. sometidas a diferentes dosis y formas de Se. Los datos son medias \pm error estándar ($n=9$)

En general, la concentración de Se incremento con la aplicación de selenato en comparación al selenito, presentando ambas formas sus máximos valores en el tratamiento de 120 μM (Fig. 2.2). Nuestros datos son concordantes con otras referencias en plantas diferentes donde el selenato provocó un aumento en la acumulación de Se en la plantas superior a la del selenito (Lee et al, 1998; 2001; Hu et al., 2002; Chen et al., 2002; Cartes et al., 2005; Pedrero et al., 2006). La concentración de selenio, nos indica que ambas formas son absorbidas, aunque el selenato es absorbido más eficazmente por la raíz y transportado hacia la parte aérea de la planta, produciéndose dando una mayor acumulación de este elemento en las hojas. Hooper y Parker (1999) ya observan que la aplicación de selenato implica una translocación de Se hacia las hojas mayor o igual al 84%, mientras que la aplicación de selenito supone la translocación de Se hacia las hoja fuera menor o igual al 47%. En resumen, considerando los datos referentes a la concentración en Se junto con los de biomasa, podemos concluir que las plantas de lechuga pueden tolerar sin que exista una disminución de biomasa concentraciones de 34 mg Se Kg^{-1} p.s., cuando el Se es aplicado a una dosis de 40 μM en forma de selenato, y de 8 mg Se Kg^{-1} p.s. cuando el Se es aplicado en una concentración de 10 μM en forma de selenito.

La efectividad de los programas de biofortificación esta limitado por la capacidad de los cultivos para la acumulación de este elemento traza en la parte comestible de las plantas. Esto es muy importante para definir el tipo de cultivo a usar con el fin de tener éxito en estos programas (Blasco et al., 2007). Uno de los principales objetivos de este capítulo es lograr una acumulación del elemento traza que pueda satisfacer la cantidad diaria recomendada en la dieta, que para los adultos esta estipulada entre 50-70 μg de Se. Nuestros resultados nos indican que las dosis de aplicación más apropiadas en un cultivo hidropónico de lechuga son de 40 μM para el selenato y 10 μM para el selenito. Ya que las ventajas que encontramos son las siguientes:

- (i) La biomasa de la parte comestible aérea no se reduce respecto a las plantas control (Fig. 2.1).
- (ii) La concentración de Se en la parte comestible de la lechuga es suficiente para cubrir las necesidades fisiológicas humanas de este

elemento, consumiendo 308 g de lechuga fresca a la semana como máximo cuando el tratamiento se trata de 40 μM de selenato, o 1500 g de lechuga fresca a la semana cuando se trata las plantas de lechuga con 10 μM de selenito.

En definitiva, los resultados expuestos hasta el momento sostienen la viabilidad del uso del cultivo de lechuga en futuros programas de biofortificación con Se.

A pesar de todos los estudios realizados sobre la aplicación de Se en las plantas, ninguno de estos confirman como este elemento traza puede influir sobre la capacidad antioxidante de los vegetales comestibles. Existen numerosas evidencias que nos indican los efectos adicionales y sinérgicos de los compuestos antioxidantes de las frutas y las verduras sobre la salud humana, ya que estos compuestos pueden disminuir el riesgo de muchas patologías relacionadas con el estrés oxidativo (Connor et al., 2005). Entre otros compuestos fitoquímicos, los compuestos fenólicos, son un grupo amplio con una variedad de estructuras químicas siendo de los compuestos más importantes como antioxidantes. Otro aspecto interesante a ser considerado es que los fenoles pueden actuar como quelatantes de metales así como inhibidores de enzimas como la xantina oxidasa, previniendo de ese modo la formación de ROS, enzimática y no enzimática. Además a los fenoles, también se le ha atribuido un posible papel anticancerígeno (Parr y Bolwell, 2000).

En general, en nuestro experimento, los fenoles incrementaron a medida que aumentamos la concentración de Se aplicada al medio de cultivo, alcanzándose el valor más elevado en la dosis de 120 μM (Tabla 2.3). Respecto a los fenoles debemos tener mayor consideración en las dosis aplicadas, ya que las formas de Se añadidas en este experimento (selenato vs. selenito) no afectaron notablemente a la concentración foliar de estos compuestos secundarios (Tabla 2.3). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Xue et al. (2003) en plantas de té, donde estos autores tampoco encontraron diferencias en el contenido fenólico tras la aplicación de selenito y selenato.

Otros compuestos a los que se atribuyen funciones antioxidantes son los flavonoides, dado que son capaces de eliminar ROS de las células vegetales (Hinonen et al., 1998; Mattäus et al., 2002). Son compuestos antioxidantes de gran importancia, ya que exhiben varias actividades biológicas incluyendo antialergénicos, antitumorales, antivirales y antioxidantes. Generalmente poseen un gran número de grupos hidroxilo, además de abundantes ortosustituciones con grupos metoxi o alquil que incrementan la estabilidad de los radicales libres y aumentan su potencial antioxidante (Rice-Evans et al., 1995). Aunque suelen encontrarse en bajas cantidades en frutas y verduras, pueden tener una gran actividad antioxidante (Shahidi y Wanasundara, 1992). La Tabla 2.3 muestra que un incremento en la dosis de Se aplicada aumenta la concentración foliar de los flavonoides. Con respecto a la forma añadida, es el selenito quien indujo una mayor acumulación de éstos en las plantas de lechuga, aunque, como en el caso de los fenoles totales, no encontramos diferencias significativas entre ambas formas de Se aplicadas (Tabla 2.3).

Además de los fenoles totales y los flavonoides, los PPGs, son definidos como compuestos intermediarios en el metabolismo fenólico, y tiene una función antioxidante en las células de las plantas (Gálvez et al., 2005). Como con los otros compuestos estudiados, un incremento en la concentración aplicada de Se provocó un aumento en el contenido de PPGs, presentándose los máximos valores en la dosis de 120 μ M (Tabla 2.3). En contraste con los flavonoides, estos compuestos alcanzan acumulaciones más elevadas cuando al medio de cultivo aplicamos selenato (Tabla 2.3).

Tabla 2.2 Efectos de la aplicación de distintas dosis y formas de Se sobre algunos compuestos fenólicos en hojas de lechuga. Los datos son medias \pm error estándar (n=9)

Tratamientos	Fenoles totales		Flavonoides		PPGs	
	SeO ₃	SeO ₄	SeO ₃	SeO ₄	SeO ₃	SeO ₄
Dosis (μM)						
0	0,54 \pm 0,07	0,54 \pm 0,07	0,36 \pm 0,05	0,36 \pm 0,05	0,06 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01
5	0,75 \pm 0,09	0,78 \pm 0,08	0,85 \pm 0,09	0,67 \pm 0,07	0,06 \pm 0,01	0,07 \pm 0,03
10	0,73 \pm 0,10	0,85 \pm 0,12	0,97 \pm 0,08	0,67 \pm 0,07	0,07 \pm 0,02	0,09 \pm 0,02
20	0,77 \pm 0,08	0,94 \pm 0,11	1,03 \pm 0,10	0,85 \pm 0,09	0,08 \pm 0,06	0,10 \pm 0,01
40	1,01 \pm 0,09	0,95 \pm 0,13	1,06 \pm 0,09	1,03 \pm 0,12	0,08 \pm 0,04	0,11 \pm 0,07
60	1,10 \pm 0,11	1,03 \pm 0,11	1,10 \pm 0,08	1,04 \pm 0,10	0,11 \pm 0,06	0,16 \pm 0,05
80	1,17 \pm 0,10	1,04 \pm 0,12	1,15 \pm 0,12	1,11 \pm 0,10	0,13 \pm 0,07	0,17 \pm 0,06
120	1,20 \pm 0,13	1,11 \pm 0,12	1,23 \pm 0,13	1,25 \pm 0,11	0,14 \pm 0,05	0,19 \pm 0,09
P-valor	***	***	***	***	***	***
LSD	0,01	0,15	0,12	0,10	0,01	0,02
Análisis de la Varianza						
Formas Se (F)	n.s		n.s		***	
Dosis Se (D)	***		***		***	
FxD	*		**		**	
LSD	0,20		0,40		0,01	

Fenoles totales expresados como: μ g ácido cafeico g^{-1} p.f.; Flavonoides expresados como: μ g Rutin g^{-1} p.f.; PPGs expresados como: μ g verbacoside g^{-1} p.f.

Los niveles de significación están representados por: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, y n.s, no significativo.

Sin embargo, el antioxidante por excelencia de los distintos productos vegetales es el ácido ascórbico, conocido como vitamina C (Smirnoff et al., 1996; Rosales et al., 2006). Diferentes trabajos han demostrado que el Se induce la acumulación de este compuesto (Lee et al., 2001; Xu et al., 2003), a pesar de que el efecto del Se está poco documentado (Lee et al., 1998). Nuestros resultados indican que un incremento en la dosis de Se aplicada en el medio de cultivo provocó una síntesis de ácido ascórbico (Fig. 2.3) y, aunque ambas formas incrementaron el contenido en ascorbato la forma en selenato dio lugar a mayores incrementos en la concentración foliar de este compuesto antioxidante (Fig. 2.3). En nuestro experimento, el efecto del Se fue opuesto al

mostrado por Lee et al. (1998), quienes observaron una disminución en ácido ascórbico a medida que se elevaba la dosis en selenito.

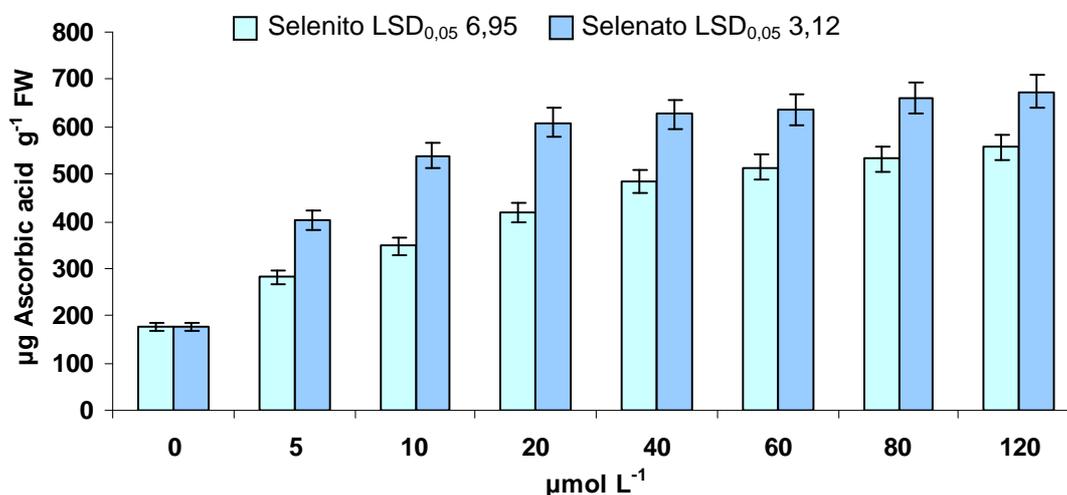


Figura 2.3 Concentración total en ascorbato de las hojas de lechugas bajo distintas formas y dosis de Se. Los datos son medias \pm error estándar (n=9)

Examinado estos resultados, nosotros encontramos que una aplicación de Se no causó efectos fitotóxicos por debajo de 40 μM para la forma en selenato, y 10 μM para el selenito (Fig. 2.1). Al mismo tiempo, la producción de compuestos antioxidantes fue claramente inducida en esos tratamientos (Tabla 2.3 y Fig. 2.3), lo que nos lleva a pensar en un posible efecto beneficioso de este elemento traza en las plantas de lechuga. A elevadas dosis de Se el contenido en estos compuestos antioxidantes también incrementó, aunque en este caso y quizás debido a los efectos tóxicos del Se, las plantas mostraron una reducción en la producción de biomasa de la parte aérea (Fig. 2.1). Finalmente, debemos resaltar que entre las dos formas aplicadas, el selenato (respecto a selenito) mostró una mayor habilidad para inducir los compuestos antioxidantes, causó una menor toxicidad, y provocó un mayor incremento de la biomasa aérea (Fig. 2.1) y de la concentración de Se en las hojas (Fig. 2.2).

Tabla 2.3 Test de capacidad antioxidante en hojas de lechuga sometida a diferentes formas y dosis de Se. Los datos son medias \pm error estándar (n=9)

Tratamientos	FRAP		DPPH		Poder Reductor	
	SeO ₃	SeO ₄	SeO ₃	SeO ₄	SeO ₃	SeO ₄
Dosis (μM)						
0	1105 \pm 40	1105 \pm 40	16,68 \pm 1,3	16,68 \pm 1,3	4480 \pm 90	4480 \pm 90
5	1846 \pm 52	1866 \pm 55	16,83 \pm 1,6	15,67 \pm 1,7	5320 \pm 87	5250 \pm 90
10	2275 \pm 50	3120 \pm 58	16,97 \pm 1,4	17,08 \pm 1,6	5351 \pm 93	5631 \pm 92
20	3395 \pm 62	3806 \pm 60	17,56 \pm 1,1	18,1 \pm 2,1	5550 \pm 96	5984 \pm 90
40	3549 \pm 58	4011 \pm 70	18,29 \pm 2,0	20,69 \pm 1,8	5794 \pm 90	6585 \pm 107
60	4306 \pm 62	4313 \pm 68	21,74 \pm 2,4	25,36 \pm 2,1	6270 \pm 98	7242 \pm 95
80	4566 \pm 69	4585 \pm 70	22,09 \pm 2,2	29,41 \pm 2,9	6307 \pm 101	7242 \pm 140
120	5290 \pm 70	5591 \pm 73	25,44 \pm 2,7	40,71 \pm 3,0	6527 \pm 117	8779 \pm 143
P-valor	***	***	***	***	***	***
LSD	137	106	2,59	3,51	144	122
Análisis de la Varianza						
Formas Se (F)	***		***		***	
Dosis Se (D)	***		***		***	
FxD	***		***		***	
LSD		83,2		2,09		90,9

El test FRAP expresado como: μ M (SO₄)Fe g⁻¹ p.f.; test DPPH expresado como % g⁻¹ p.f.; test del Poder Reductor expresado como % de actividad equivalente al ácido ascórbico (1 mM) g⁻¹ p.f.

Los niveles de significación están representados por: * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, y n.s, no significativo.

Recientemente, un número de test han sido desarrollados para el estudio general de la capacidad antioxidante en los distintos extractos vegetal. Estos ensayos miden la habilidad para reducir sustancias pro-oxidantes mediante el uso de diferentes radicales o iones metálicos como oxidantes (Sheiser et al., 2002). Uno de los test más ampliamente usados que miden la capacidad antioxidante es el FRAP, el cual en nuestro trabajo presentó el mismo comportamiento que los diferentes compuestos antioxidantes analizados, ya que un incremento en la aplicación de Se en el medio de cultivo aumentó los valores de este test, presentando el máximo valor en la concentración de 120 μM (Tabla 2.4). Considerando las formas de Se aplicadas, el selenato alcanzo valores superiores a los obtenido con el selenito (Tabla 2.4). Finalmente, otros de los test usados para cuantificar la capacidad antioxidante de los compuestos en el presente capítulo son el DPPH y el Poder Reductor. Para ambos test, el aumento en la dosis aplicada de Se produjo un incremento proporcional en los valores, siendo la forma de selenato la que registró una mayor inducción para los datos de estos test (Tabla 2.4). En resumen, todos los resultados indican que la aplicación de Se en cualquiera de sus formas induce la capacidad antioxidante en la lechuga, aumentando esta capacidad a medida que se incrementa la dosis de Se añadida y encontrando valores más elevados cuando el Se fue añadido bajo la forma de selenato. Nuestros resultados coinciden con la literatura disponible al respecto (Hartikainen et al., 2000; Lee et al., 2001; Xue et al. 2001; Xu et al., 2003; Ligan et al., 2005), dado que la aplicación de selenato en diferentes plantas y bajo distintas condiciones produjo un incremento de la capacidad antioxidante.

Tabla 2.5 Coeficientes de correlación, para la relación entre los test de capacidad antioxidante y los compuestos antioxidantes

Compuestos Antioxidantes	Test Antioxidantes		
	FRAP	DPPH	Test del Poder Reductor
Compuestos Fenólicos	0,83***	0,55***	0,59***
Flavonoides	0,79***	0,64***	0,66***
PPGs	0,01 n.s	0,15 n.s	0,13 n.s
Ascorbato	0,83***	0,68***	0,81***

Los niveles de significación están representados por: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, y n.s, no significativo.

La Tabla 2.5 presenta los coeficientes de correlación entre los diferentes compuestos antioxidantes y los test de capacidad antioxidante analizados en nuestro experimento. Nuestros resultados muestran una estrecha correlación entre los fenoles totales, flavonoides y ácido ascórbico y el test FRAP (Tabla 2.5). Por el contrario, la relación entre estos compuestos y los test DPPH y Poder Reductor, aunque positiva, fue menos significativa, ya que mostraron un bajo coeficiente de correlación (Tabla 2.5). Según estos análisis de regresión los test DPPH y Poder Reductor en nuestro experimento podrían no ser aconsejables para cuantificar la capacidad antioxidante en las hojas de lechuga sometidas a diferentes dosis y formas de Se. Nuestros resultados son similares a los obtenidos por Galvez et al. (2005), quienes encontraron una mínima relación entre el contenido en flavonoides y los resultados obtenidos con el test DPPH. Finalmente, debemos señalar que los PPGs no mostraron coeficientes estadísticos significativos con los distintos test aplicados en nuestro trabajo. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Gálvez et al. (2005), donde mostraron una fuerte relación entre el contenido de estos compuestos y el test DPPH, sugiriendo una posible responsabilidad de los PPGs en la capacidad antioxidante. En definitiva, nosotros definimos al ácido ascórbico como el principal compuesto que puede reflejar la capacidad antioxidante en nuestro trabajo dado que mostró una buena relación con el FRAP y Poder Reductor. Indicar como se indica en otros trabajos que no se puede descartar a los

fenoles totales puesto que también resultan por lo general buenos indicadores de la capacidad antioxidante (Xu et al., 2003; Leja et al., 2001).

2.4. Conclusión

En conclusión, y de acuerdo con nuestros resultados, la aplicación de Se en forma de selenato podría ser más beneficiosa para un programa de biofortificación con este elemento traza, ya que es menos fitotóxico que el selenito, induce un mayor crecimiento, y causa más acumulación de Se en las hojas de lechuga. En cuanto a la capacidad antioxidante, en general el Se incrementa los compuestos antioxidantes en las hojas (por consiguiente, aumenta la calidad nutricional de la cosecha), siendo estos compuestos inducidos más eficientemente por el selenato que el selenito. En definitiva, para una máxima capacidad antioxidante y concentración en Se, sin una pérdida en biomasa foliar, la dosis y forma más apropiada de aplicación podría ser de 40 μM de selenato. Además, bajo esta dosis la concentración de Se en las hojas es suficiente para cubrir las necesidades fisiológicas humanas de este elemento si consumimos 308 g de lechuga fresca a la semana, sin que se produzca efecto tóxico sobre los humanos, ya que esta dosis no excede la dosis máxima recomendada (Tinggi, 2003). Todos estos resultados en definitiva garantizan la viabilidad del uso del cultivo de lechuga en un programa de biofortificación. Finalmente, resaltar, en cuanto a los test antioxidantes, que solo el FRAP mostró una relación significativa con los distintos compuestos antioxidantes, y que el ascorbato es el compuesto que más refleja el efecto del Se sobre la capacidad antioxidante bajo nuestras condiciones experimentales.

Capítulo 3
Regulación de la asimilación del
Azufre en plantas de lechuga
sujetas al Se

3.1. Introducción

El azufre (S) es el macronutriente menos abundante en las plantas superiores representando tan solo el 0,1% de la materia seca, mientras que por ejemplo el Nitrógeno supera el 2% y el Carbono alcanza el 45% de la materia seca. Este nutriente es el principal componente empleado en la síntesis de los aminoácidos cisteína y metionina, del tripéptido glutatión y otros metabolitos secundarios esenciales. Sin embargo, la investigación sobre este macronutriente en plantas ha sido hasta el momento menos importante que la realizada por ejemplo para los nutrientes N o P. En la actualidad, y debido a la aparición en la agricultura de problemas relacionados con la deficiencia de S, su investigación se ha acelerado e intensificado de manera importante, y es cuando se está comprobando realmente su esencialidad en las plantas superiores (Marschner, 1995).

La deficiencia de S, que está apareciendo en muchas zonas agrícolas industrializadas del mundo, afecta gravemente a la producción y principalmente a la calidad y valor nutritivo de muchos cultivos, debido a la disminución que se produce en la síntesis de los aminoácidos cisteína y metionina, ambos esenciales en la dieta de los animales (Mengel y Kirkby, 2001).

Las plantas, por lo general y en la mayoría de los casos, toman el S principalmente de la solución del suelo por las raíces bajo su forma de anión oxidado, es decir como sulfato (SO_4^-), utilizando para ello mecanismos activos dependientes de un gasto energético. A pesar de que el SO_4^- es relativamente abundante en el medioambiente, las plantas han desarrollado mecanismos que regulan tanto su absorción radicular como su asimilación en respuesta a factores tales como: (i) su disponibilidad en el medio, (ii) el crecimiento y estado de desarrollo de la planta.

La zona radicular donde la absorción de SO_4^- es más intensa corresponde con la zona apical formada por pelos radiculares. Bowen y Rovira (1971)

observaron que la zona de mayor absorción de SO_4^{2-} comprendía los primeros 5 cm a partir del ápice radicular. En apoyo a estas observaciones, y aunque las investigaciones a este respecto son escasas, se ha comprobado que ante una situación de limitación de S se produce una adaptación en la arquitectura radicular, consistente en la formación de numerosas nuevas raíces laterales concretamente en la zona apical (Hell y Hillebrand, 2001).

El SO_4^{2-} es activamente cotransportado dentro de la célula radicular conjuntamente con H^+ en una relación $1\text{SO}_4^{2-} : 3\text{H}^+$. Este transporte se produce gracias al mantenimiento de un potencial de membrana provocado por la salida de H^+ que lleva a cabo la enzima H^+ -ATPasa de la membrana plasmática. Este proceso de absorción fue confirmado inicialmente por Lass y Ullrich-Eberius (1984), que trabajando con *Lemma minor* L. observaron que la aplicación de SO_4^{2-} tras un periodo de limitación era acompañado por una aparición del potencial de membrana cuya magnitud dependía de la concentración externa aplicada de SO_4^{2-} . Actualmente, se ha comprobado la absorción de SO_4^{2-} es inhibida si aparecen factores tales como el incremento del pH en el medio externo o la disminución de la actividad H^+ -ATPasa de membrana.

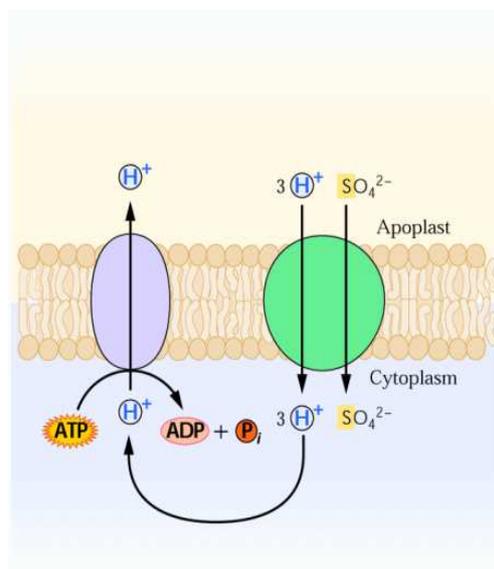


Imagen 3.1: Transportadores de membrana radiculares del SO_4^{2-}

Una vez que los SO_4^{2-} entran en la células radiculares, éstos deben de dirigirse hacia los cloroplastos de las hojas donde mayoritariamente son asimilados.

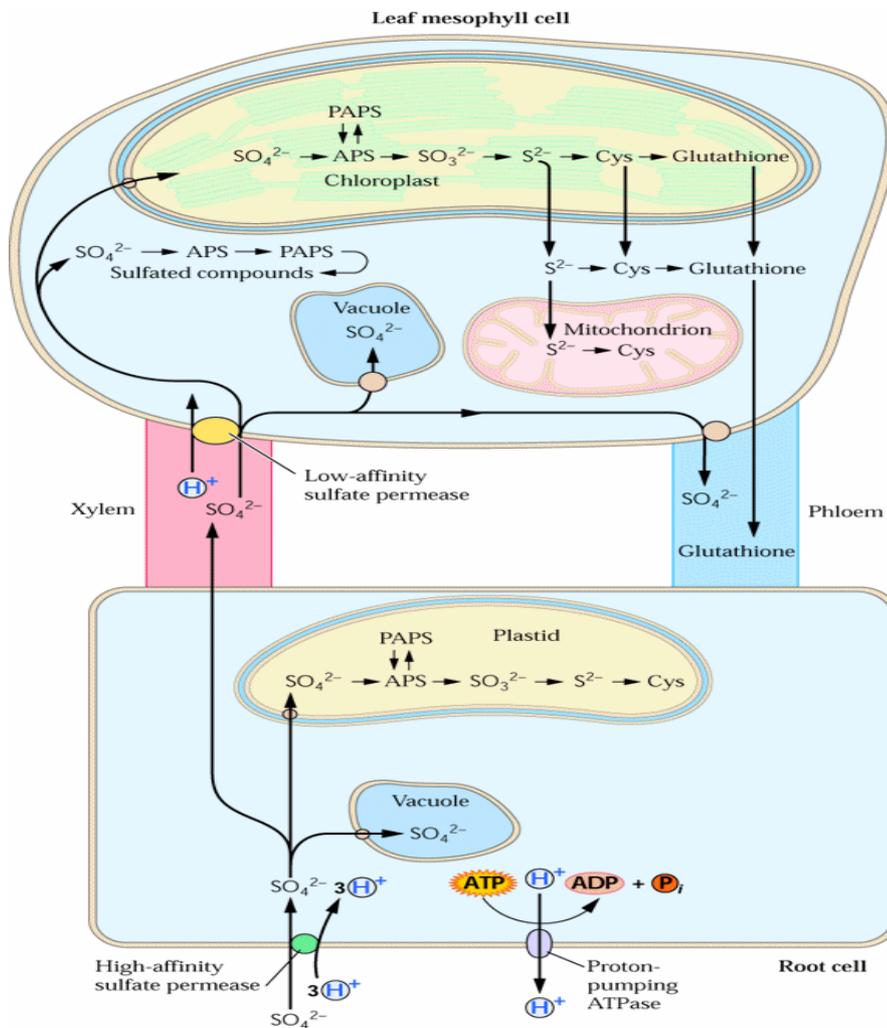


Imagen 3.2: Esquema general de la absorción y asimilación de SO_4^{2-}

En cuanto a la asimilación del SO_4^{2-} , esta se divide en tres etapas: activación del SO_4^{2-} , reducción del SO_4^{2-} , y finalmente la incorporación del sulfuro a cisteína. Este proceso metabólico es un proceso que supone para las plantas un gasto energético muy importante de 732 kJ mol^{-1} . Los lugares donde se produce la asimilación del SO_4^{2-} es en los plastidios, aunque según las investigaciones al respecto parece que los cloroplastos de las hojas es donde tiene lugar la mayor parte del paso de SO_4^{2-} a cisteína (Leustek et al., 2000).

La activación del SO_4^- , que es un anión bastante estable, es esencial para iniciar este proceso metabólico. Es catalizada por la enzima ATP-sulfurilasa (ATP-S). Como se puede observar en la siguiente figura la reacción consiste en la transferencia del grupo sulfidril procedente del SO_4^- al ATP resultando en la formación del compuesto 5'-adenilfosfosulfato (APS) (Suter et al., 2000)

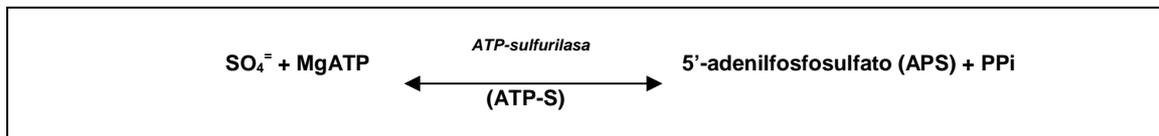


Imagen 3.3: Activación del SO_4^- , catalizada por ATP-S

Las propiedades de esta enzima fueron estudiadas inicialmente en hojas de espinaca donde se encontraron dos isoformas de la enzima. Posteriormente, estudios de localización subcelular y de cinética de la actividad indicaron que la isoforma más importante estaba localizada en el cloroplasto y representaba entre el 80-90% del total de la enzima ATP-S, mientras que la isoforma minoritaria se encuentra localizada en el citoplasma y en la mitocondria y su papel en la asimilación del SO_4^- aún no es conocida.

Al ser esta enzima la que inicia la asimilación del SO_4^- , durante mucho tiempo ha recibido bastante atención puesto que por lo general las primeras reacciones de un proceso metabólico suelen ser buenas candidatas en el control y en la regulación de éste. Debido a esta razón, la enzima ha sido utilizada para la generación de plantas transgénicas. Sin embargo, los resultados obtenidos hasta el momento no son muy claros e indican que esta enzima no intervendría de forma limitante en el control de la asimilación del SO_4^- . En la literatura disponible hasta el momento encontramos un solo caso de que la sobre-expresión de la ATP-S incrementa la absorción y asimilación del SO_4^- . Este trabajo fue publicado por Pilon-Smits et al. (1999) utilizando *Brassica juncea*. Por el contrario, la sobre-expresión de la enzima ATP-S en plantas de tabaco no produjo cambios en la asimilación del SO_4^- (Hatzfeld et al., 1998). Otro estudio, fue realizado por Saito (1999), quien observa que las variaciones del nivel de SO_4^- en el medio externo no varían la expresión ni actividad de la enzima ATP-S.

Finalmente, y lo que si parece estar demostrado en cuanto a la regulación de la actividad ATP-S es que es fuertemente inhibida por los productos finales de la asimilación del SO_4^- , como la cisteína, el glutatión y la metionina, por lo que se ha propuesto que la expresión del gen así como su actividad estén reguladas por la demanda por parte de la planta de los productos finales de la asimilación del SO_4^- .

En cuanto al proceso de reducción del SO_4^- , según Leustek et al. (2000) esta fase se produce en dos etapas. Una primera etapa en la que intervendría la enzima APS-reductasa la cual reduce el compuesto APS para producir sulfito, y una segunda etapa en la que el sulfito es reducido por la sulfito reductasa a sulfuro.

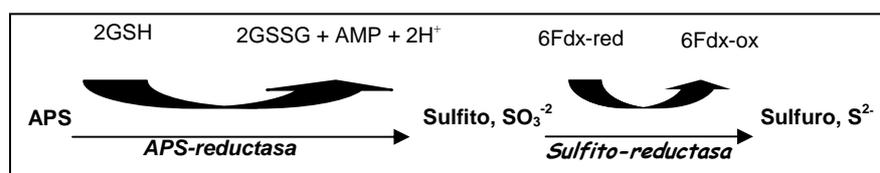


Imagen 3.4: Reducción del SO_4^- , catalizada por las enzimas APS-reductasa y Sulfito-reductasa

Aunque todavía existe muy poca investigación al respecto parece ser que la enzima APS-reductasa podría ser clave en la asimilación de SO_4^- . Finalmente, la enzima sulfito-reductasa parece ser que no es regulada significativamente por el estado nutricional de S, y se cree que su expresión es constitutiva. Posiblemente, esto se deba que el sulfito, al igual que los nitritos, son tóxicos para las células por lo que es necesario como mecanismo de prevención que esta enzima mantenga un nivel elevado tanto de expresión como de actividad con el fin de evitar la acumulación de sulfito.

La mayoría de las biomoléculas que contienen S en las plantas son sintetizadas directa o indirectamente a partir del aminoácido cisteína, por lo que la formación de este aminoácido se define como esencial en la asimilación de SO_4^- a compuestos orgánicos.

La primera etapa en la síntesis de cisteína es realizada por la enzima serina acetiltransferasa (SAT), la cual cataliza el paso de un grupo acetyl, procedente del Acetil-CoA, al aminoácido L-serina para formar el compuesto O-acetil-L-serina (OAS). La siguiente reacción es catalizada por la enzima O-acetilserina-(tiol)lasi (OAS-TL), y consiste en la sulfhidrilación de la OAS en presencia de sulfuro dando lugar a cisteína y acetato (Läuchi, 1993).

Ambas enzimas, SAT y OAS-TL, han sido localizadas tanto en los plastidios como en el citoplasma y mitocondrias, lo que sugiere que la síntesis de la cisteína tiene lugar en todos los compartimentos celulares donde se producen habitualmente proteínas.

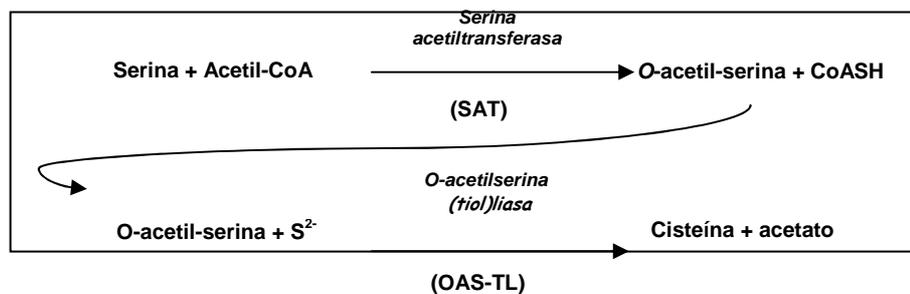


Imagen 3.5: Incorporación del S a cisteína

A pesar de que la actividad SAT es inferior a la actividad OAS-TL, y que la razón entre estas dos enzimas en el cloroplasto es de 300:1 a favor de la OAS-TL, se ha definido a la enzima SAT como la enzima clave y determinante de la síntesis de cisteína en plantas (Droux, 1998). Las evidencias que han confirmado el papel esencial de la enzima SAT en la formación de cisteína han sido las siguientes:

- (i) La sobre-expresión de la enzima OAS-TL en plantas de tabaco no produce un aumento de la síntesis de cisteína ni de compuestos derivados de este aminoácido como el glutatión y la metionina.
- (ii) La sobre-expresión del gen que codifica la enzima SAT en plantas de patata y de tabaco es acompañado por un incremento muy significativo de la cantidad de cisteína y de glutatión.

- (iii) La aplicación externa de cisteína produce la inhibición de la enzima SAT y no de la enzima OAS-TL.

La asimilación de SO_4^- es regulada con el fin de mantener unos niveles constantes de cisteína en las células dado la importancia biológica que tiene este aminoácido en el desarrollo de las plantas y en la aparición de respuestas de adaptación o aclimatación ante distintos tipos de estrés. Por esta razón, unos de los factores reguladores más estudiados es la exposición al estrés. La mayoría de los estreses tanto biótico como abióticos suelen incrementar la demanda de cisteína para formar glutatión, compuesto derivado de la cisteína y clave en las respuestas al estrés, causando por la tanto un aumento de la absorción y asimilación del SO_4^- . Un ejemplo claro de este incremento ha sido descrito recientemente por Ruiz y Blumwald (2002), estudiando el estrés salino. Estos autores demuestran que ante condiciones de salinidad la absorción de SO_4^- y posterior síntesis de cisteína es superior en plantas de *Brassica napus* no tolerantes que en plantas transgénicas resistentes a la salinidad. Según estos autores las plantas no modificadas genéticamente, y por lo tanto no resistentes, sufren un estrés muy superior al de las plantas transgénicas lo que produce como respuesta en las primeras un aumento de la asimilación SO_4^- y síntesis de glutatión para evitar así los efectos tóxicos de la salinidad.

Sin embargo, el factor que más altera la asimilación de SO_4^- es la variación del estado nutricional de S en el medio externo. En distintos trabajos se ha observado que la regulación afecta inicialmente a las raíces mientras que en las hojas el efecto inicial es menor ya que estas utilizan los SO_4^- almacenado en las vacuolas para evitar diferencias significativas en la concentración celular de este anión. El modelo que actualmente se utiliza para explicar la regulación de SO_4^- ante variaciones en su concentración externa es el propuesto por Leustek et al., (2000). En este modelo, estos autores proponen a los compuestos OAS, cisteína y glutatión como los responsables o como las señales que regulan la asimilación de SO_4^- . Así bajo condiciones deficientes de SO_4^- el incremento en la concentración de OAS estimula la síntesis de los transportadores de SO_4^- de alta afinidad en las raíces y de las enzimas responsables de la activación (ATP-sulfurilasa) y reducción (APS-reductasa) en

hojas. Por el contrario, bajo condiciones de elevadas concentraciones de SO_4^- son los compuestos cisteína y glutatión los que reducen el proceso de asimilación de SO_4^- .

A pesar de la importancia del metabolismo del S, como hemos visto, para el desarrollo de la planta, no existen trabajos previos que analicen a fondo el posible efecto de la aplicación de Se sobre elementos esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas, como es el caso del S. Dado que el Se no es un elemento esencial para las plantas y ambos elementos (Se y S) presentan propiedades químicas similares, ya que se encuentran muy próximos en la tabla periódica (Barak y Goldman, 1997; White et al. 2004), el estudio de su posible interacción es necesario para un desarrollo efectivo y mejora de los programas de biofortificación con dicho elemento.

A pesar de que la literatura sobre este tema es mínima, diferentes investigadores (Läuchli et al., 1993; Barak y Goldman, 1997; Kospell, 1997) han indicado que el selenato es absorbido por los mismos transportadores que el SO_4^- , y por tanto los dos iones tienen una relación antagónica, que provoca una disminución en la concentración de S en las plantas. Previamente, Ferrari y Renosto (1972) observaron que la absorción del SO_4 y el selenato disminuían con el incremento del pool de proteínas. Además, de acuerdo con el estudio de Anderson (1993), el metabolismo del Se sigue la misma ruta que el S, dado que ambas moléculas tiene muchas similitudes químicas, y por lo tanto las enzimas involucradas en el metabolismo del S pueden catalizar reacciones análogas con los correspondientes sustratos del Se, produciéndose productos finales de su asimilación como son la selenocisteína o selenoproteínas (Anderson, 1993). Finalmente, White et al. (2004) confirma estos resultados, ya que sugiere que la competencia entre el Se y el S en los procesos bioquímicos de incorporación a proteínas, causan la toxicidad de Se en las plantas, ya que las proteínas formadas mediante la incorporación de selenio-aminoácidos son afuncionales, por pérdida de su estructura conformacional.

Por el contrario, otros estudios realizados por Mikkelsen et al. (1990), y más recientemente por Lyons et al. (2005), sugieren que existe un sinergismo entre

el Se y el S cuando la concentración de ambos elementos en el medio de cultivo no es muy elevada, dando como resultado una acumulación de Se y S en las plantas estudiadas. Además, Pilon-Smith et al. (1999), trabajando con plantas de mostaza, indican que un incremento en la actividad de la ATP-S causa una mejor asimilación del Se y S cuando se añaden estos elementos de forma conjunta a la solución nutritiva.

En definitiva, y con el propósito de aportar nuevos datos a la interacción Se-S en el presente capítulo, analizamos el efecto que la aplicación de Se, en dos formas diferentes (selenato y selenito), ejerce sobre la asimilación de SO_4^- en plantas de lechuga, con el objetivo de definir tanto la dosis como la forma de Se más adecuada a para llevar a cabo un programa de biofortificación con este elemento traza sin que se produzca una disminución de la asimilación del SO_4^- y por tanto en el crecimiento de las plantas.

3.2. Material y Métodos

Los apartados correspondientes a material vegetal y condiciones de crecimiento, muestreo vegetal y análisis estadístico fueron similares a los descritos en el capítulo 2 (*véase en material y métodos, capítulo 2 (2.2)*).

Análisis de las plantas

3.2.1. Determinación de la actividad ATP-sulfurilasa

La actividad ATP-sulfurilasa fue medida usando la formación de pirofosfato dependiente de molibdeno, como describe Lappartient y Touraine (1996).

La extracción de la enzima se realizó mediante la maceración de 0,5 g de material vegetal fresco en tampón Tris-HCl pH 8 que contenía, EDTA- Na_2 10 mM, DTT 2mM y PVPP 1%. Posteriormente fue centrifugado a 13000 rpm durante 10 min. La cuantificación se realizó incubando durante 5 min a 37 °C; 50 μl de extracto junto a 250 μl de una mezcla de reacción la contenía: tampón

Tris-HCl 80 mM pH 8, MgCl₂ 7 mM, ATP 2mM, molibdato sódico 5mM y 0,032 unidades/ml de pirofosfatasa inorgánica libre de sulfato. Además se realizó un control al cual se le añadió todos los componentes anteriores excepto el molibdato sódico. Transcurrido ese tiempo, la reacción fue parada mediante la adición de 0,5 ml de tampón acetato sódico cuya concentración fue 0,5 M y con un pH de 4. A continuación se le añadió 100 µl de una solución que contuvo: 0,25 g de molibdato sódico, 0,5 g de ácido ascórbico y 5 µl de ácido sulfúrico, todo diluido en 25 ml de agua destilada. Pasados 10 min se midieron a 660 nm frente a una curva patrón de Pi.

3.2.2. Determinación de la actividad *Serina-acetiltransferasa*

El método utilizado para la determinación de la actividad SAT, se basa en la formación de cisteína medida por el reactivo de nihidrina, descrito por Nakamura et al. (1987).

El extracto enzimático se obtuvo mediante la homogeneización de 0,5 g de material vegetal fresco en 5 ml de tampón K₂HPO₄-KH₂PO₄ 0,2 M pH 8, que contenía 10 mM de 2-mercaptoetanol y 0,5 mM de EDTA-Na₂. El homogenizado obtenido se filtró y centrifugó a 9500 rpm durante 10 min. A continuación se mezclaron 500 µl de extracto enzimático junto a 700 µl de mezcla de reacción que consistió en: K₂HPO₄ 2mM, serina 2 mM, acetilCoA 250 µM, sulfuro sódico 500 µM. Y se incubó a 25 °C durante 20 min. Posteriormente se paró la reacción mediante la adición de 400 µl de HCl 4 M, y se centrifugó la mezcla a 11500 rpm durante 3 min. Del sobrenadante obtenido se tomó una alícuota de 500 µl a la que se añadió 200 µl de nihidrina. Se incubó durante 10 min en un baño de agua hirviendo, y posteriormente se introdujeron en un baño de hielo, y se les añadió 400 µl de etanol 98%. Transcurridos 15 min., se procedió a la medición de la cisteína formada a 560 nm.

3.2.3. *Determinación de la actividad O-acetilserina(tiol)liasa*

La actividad de dicha enzima se midió, usando el mismo extracto obtenido durante la maceración para la extracción de la SAT, se basa en la formación de cisteína medida por el reactivo de nihidrina, descrito por Nakamura et al. (1987).

Se tomó una alícuota de 250 μ l de extracto enzimático, además se adicionó 600 μ l de tampón Tris-HCl 0,2 M pH 7,5 que contenía 10 mM de DTT y 2,7 mM de sulfito sódico; junto a 100 μ l de O-acetilserina al 0,14%. Esta mezcla se incubó durante 5 min. a 25 °C. Transcurrido este tiempo, la reacción fue parada mediante la adición de 400 μ l de HCl 4 M, y se centrifugó a 11500 rpm. Del sobrenadante obtenido se tomó una alícuota de 200 μ l a la que se añadió 300 μ l de nihidrina. Se incubó durante 10 min en un baño de agua hirviendo, y posteriormente se introdujeron en un baño de hielo, y se les añadió 400 μ l de etanol 98%. Transcurridos 15 min., se procedió a la medición de la cisteína formada a 560 nm.

3.2.4. *Concentración en cisteína total y grupos tioles*

La determinación de cisteína se basa en la reacción entre grupos sulfidrilo y el metilglioxal. Así, se homogeneizó 0,5 g de material vegetal fresco en 5ml de una solución mezcla de: ác. Sulfosalicílico 80 mM, EDTA- Na_2 1mM y ascorbato sódico al 15%. El homogeneizado se centrifugó a 16000 rpm durante 15 min. Posteriormente la cuantificación se realizó de la siguiente manera:

Los tubos de las muestras consistieron: 0,5 ml de alícuota, 0,5 ml de MES 0,05M pH 5,8, 0,05 ml de metilglioxal. Además se realizaron dos tubos controles diferentes por uno de los tubos muestra y un blanco. Los tubos control 1 contenían: 0,5 ml de alícuota, 0,5 ml de MES 0,05M pH 5,8, 0,05 ml de metilglioxal. Los tubos control 2 contenían: 0,5 ml de alícuota, 0,5 ml de MES 0,05M pH 5,8, 0,05 agua destilada. El Blanco, se realizo sustituyendo la alícuota por ác. ascórbico al 15%. A continuación los tubos se pusieron a incubar durante 10 min a 30 °C. Transcurrido el tiempo, se les añadió a todos

los tubos 0,05 ml de DTNB junto a 0,5 ml de tris-HCl 0,4 M pH 8. Se leyeron todos los a 415 nm de longitud de onda. Con las muestras se mide los grupos –SH totales. Si se le restan los controles 2 obtenemos la cisteína. Los controles 1 se utilizan para corregir la absorbancia de las muestras.

3.2.5. *Concentración en aminoácidos solubles*

Para la determinación de la concentración de aminoácidos se siguió el método de Yemm y Cocking (1955). Se homogeneizó 0,5 gr de material vegetal en 5 ml de tampón fosfato 50 mM pH= 7. El homogeneizado se filtró y se centrifugó a 10000 rpm durante 15 minutos. Posteriormente se tomó 0,1 ml de extracto, y se le adicionó 1,5 ml de ninhidrina, y los tubos se pusieron a incubar durante 20 min. en un baño de agua a 100 °C. Una vez transcurrido el tiempo, se metieron los tubos en un baño de hielo, y ya fríos dentro del baño se les añadió 8 ml de propanol al 50%. Pasados 30 min. las muestras se midieron mediante espectrofotometría a 570nm frente al patrón de glicina.

3.2.6. *Concentración de proteínas solubles*

Para la determinación de la concentración de las proteínas solubles se siguió el método de Yemm y Cocking (1955), se utilizó el extracto obtenido para la determinación de aminoácidos. Se tomó del extracto entre 20-40µl y se le añadió agua hasta completar 100 µl y posteriormente se añadió 4ml de Cromassie. Los tubos se agitaron y se incubaron 30 minutos. Transcurrido ese tiempo se midió la absorbancia a 595 nm por espectrofotometría frente a una curva patrón BSA.

3.2.7. *Concentración en S orgánico*

Se pesó 0,15 g de material vegetal seco en un trocito de papel celofán transparente. Una vez pesado, se introdujo junto al material vegetal una bolita de vidrio y se envolvió todo a modo de caramelo. El envuelto se introdujo en un tubo de mineralización. Posteriormente, se le añadió a cada tubo de

mineralización 2,5 ml de ácido nítrico al 69% y 2,5 ml de ácido perclórico al 60% y se dejaron reposar los tubos durante 48 horas. A continuación, los tubos se introdujeron en un baño de arena con una temperatura entre 90-100°C. Esta temperatura se mantendrá en el baño durante aprox. 24 horas. Transcurrido este tiempo, la temperatura del baño de arena se aumentó a 325-350 °C. Una vez que el baño alcanzo esta temperatura, se comienzo a adicionar a los tubos entre 0,1 y 0,3 ml de peróxido de hidrógeno cada 30 min. aproximadamente. Este procedimiento se repitió tantas veces como sea fue necesario hasta que las muestras vegetales quedaron totalmente transparentes. Una vez que todos los tubos alcanzaron un color totalmente transparente, los tubos se sacaron del baño de arena y se les añadió a cada uno de ellos 20 ml de agua desionizada. Finalmente, los tubos se agitaron enérgicamente.

Posteriormente se tomaron alícuotas de 1 ml a las que se le adicionaron 4 ml de cloruro bórico al 8% junto a 1 ml de goma de acacia al 25%. Los tubos fueron agitados, y se procedió a la lectura de la tramitancia a 420 nm frente a una curva patrón de sulfatos en el espectrofotómetro (Novozamsky y Vaneck, 1977).

3.3. Resultados y Discusión

En las plantas la absorción y acumulación de Se es importante para la efectividad de los programas de biofortificación. Además, la posible implicación de este elemento en la absorción y asimilación del S, y consecuentemente en la concentración final del mismo, ofrece algunas ideas de la posible interacción que se puede producir entre estos dos elementos, y por tanto de la repercusión potencial sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas. Así, en la Fig. 2.2 (véase en capítulo 2) se muestra que la concentración foliar de Se incrementó con la dosis ($P < 0,001$), hasta la concentración de 120 μM , para ambas formas de selenio añadidas (Fig. 2.2, véase en capítulo 1). Indicar que, como refleja la Fig. 2.2 (véase en capítulo 1), en todas las dosis aplicadas la concentración foliar de Se obtenida fue superior con la aplicación de selenato que con selenito.

En cuanto a la concentración foliar de S total, la aplicación de selenito no dio lugar a variaciones significativas en este nutriente ($P > 0,05$), y por tanto no encontramos interacción con el S cuando el Se fue añadido en forma de selenito (Fig. 3.1). Nuestros resultados son similares a los de Hoopper y Parker (1999), quienes observaron un antagonismo del selenito principalmente con el ión fosfato pero no con el $\text{SO}_4^{=}$.

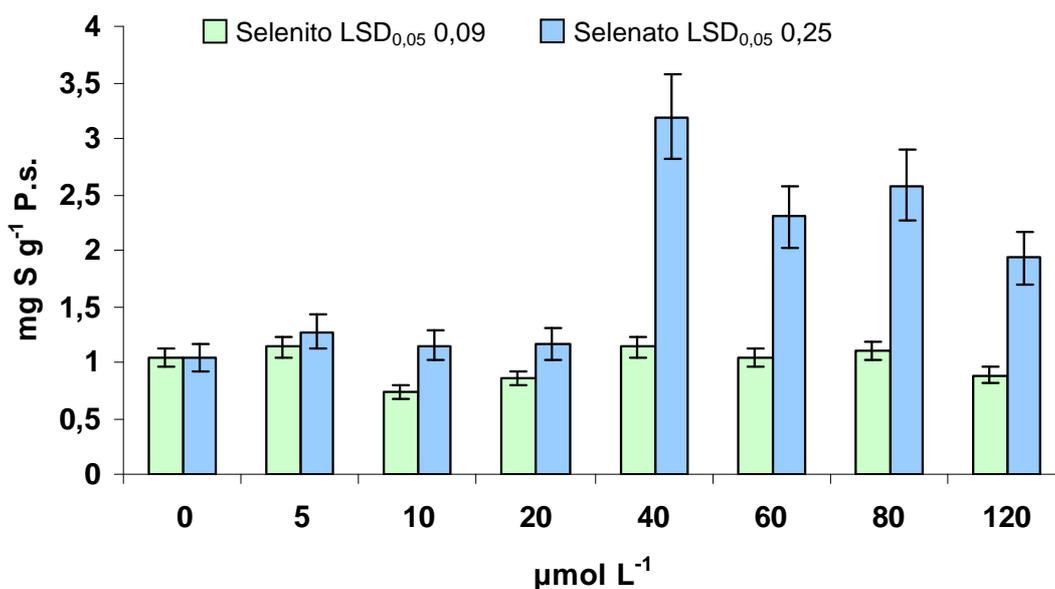


Figura 3.1 Concentración foliar de S encontrada en plantas de lechuga sometidas a distintas dosis y formas de Se. Los datos son medias \pm error estándar ($n=9$).

Por el contrario, cuando el Se fue aplicado en forma de selenato, la concentración foliar de S claramente incremento, hasta la dosis de $40 \mu\text{M}$, tras la cual la concentración de S disminuyó ($P < 0,001$; Fig. 3.1). Estos resultados implican que no existe un comportamiento antagónico entre ambos elementos cuando las concentraciones aplicadas fueron menores de $40 \mu\text{M}$ de selenato, reflejando hasta dicha dosis una relación sinérgica, como fue sugerido por Mikkelsen y Van (1990) cuando la concentración de los dos elementos eran bajas en el medio de cultivo. Además, nuestros datos concuerdan con los encontrados por White et al. (2004), quienes indicaron que a concentraciones de S menores de 4 mM en la zona radicular, como es nuestro caso, la aplicación de selenato podría promover la absorción de S. Sin embargo, la

aplicación de dosis superiores de 40 μM de selenato supuso una disminución de la concentración foliar de S sugiriendo un posible comportamiento antagónico entre ambos elementos a partir de estas dosis. Nuestros resultados son similares a los de Kopsell y Randle (1997) obtenidos en plantas de cebollas. Estos autores observaron que la aplicación de elevadas concentraciones de selenato producía una reducción del S en las plantas.

El primer paso en el proceso de asimilación del S es la activación del SO_4^- por la enzima ATP-S, la cual produce APS a partir de SO_4^- y ATP (Pilon-Smits et al. 1999). Diferentes estudios atribuyen a esta enzima una función reguladora de la vía de asimilación (Logan et al., 1996; Lappartient et al., 1999). En este sentido, Pilon-Smits et al. (1999) confirmaron que la enzima ATP-S tenía una función esencial en la asimilación del SO_4 y quizá podría estar limitando el flujo de la asimilación de Se, mientras que una sobreexpresión de esta enzima podría incrementar el flujo de dicha vía. Por el contrario existen otros trabajos como el realizado por Hatzfeld et al. (1999) quienes sobre-expresaron la enzima ATP-S en plantas de tabaco sin que se produjese ningún cambio en la asimilación de SO_4^- y el realizado por Saito (1999) quién observó que las variaciones del nivel de SO_4^- en el medio externo no varían la expresión ni la actividad de la enzima ATP-S.

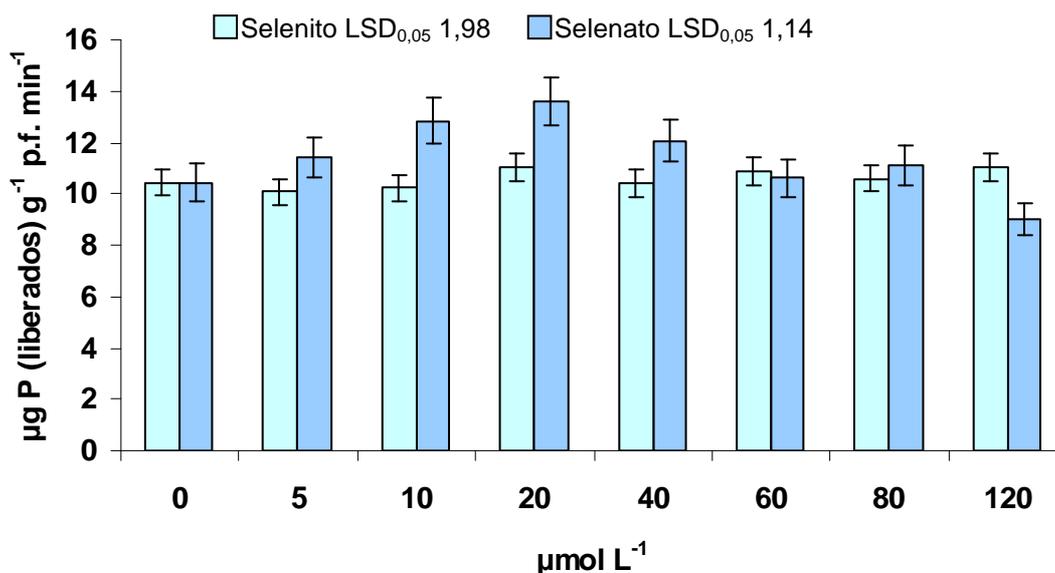


Figura 3.2 Actividad ATP-S en hojas de lechugas sometidas a distintas formas y dosis de Se. Los datos son medias \pm error estándar (n=9)

En la Figura 3.2 se presenta los resultados de la actividad ATP-S, y podemos observar como no existieron diferencias significativas en la actividad de la enzima para las distintas dosis de aplicación de selenito. Por el contrario, cuando la forma administrada fue selenato la actividad incremento hasta la concentración de 20 μM donde se presentó el máximo valor. A partir de esta concentración la actividad disminuyó hasta el mínimo valor que encontramos en la dosis de 120 μM (Fig. 3.2). Además, detectamos diferencias al comparar la forma de Se aplicada (selenito vs. selenato) (Fig. 3.2), ya que los valores más elevados de la ATP-S fueron registrados con la adición de selenato, cuando la concentraciones aplicadas fueron bajas (10, 20, 40 μM). En resumen, estos resultados indican que la aplicación de selenito no afectaría al primer paso de la asimilación de SO_4^- mientras que el selenato aplicado a bajas dosis (hasta 40 μM) induciría la activación del SO_4^- gracias a la estimulación de la actividad ATP-S. Finalmente, indicar que la disminución de la actividad ATP-S cuando aplicamos elevadas dosis de selenato (Fig. 3.2) podría deberse a un aumento de las concentraciones foliares tanto de S (Fig. 3.1) como de Se (Fig. 2.2, véase en capítulo 2) así como de los productos finales de la asimilación de estos elementos, lo que repercutiría en una disminución de la actividad ATP-S. Esta hipótesis podría ser sostenida por la conclusión descrita por Lappartient y Touraine (1996), quienes mantienen que la concentración de los productos finales del metabolismo tanto de S como de Se regulan la actividad de la enzima ATP-S.

Otro paso importante en la asimilación del selenato y SO_4^- es la incorporación del Se y S a cisteína, mediante las enzimas SAT y OAS-TL (Witz and Droux, 2005). Durante la biosíntesis de cisteína un grupo acetil del Acetil-CoA es transferido a la L-serina produciendo OAS. Esta reacción es catalizada por la enzima SAT. Posteriormente la síntesis de cisteína en plantas es realizada mediante la sulfhidrilación del OAS en presencia de sulfuro. Esta reacción es catalizada por OAS-TL. Existen considerables evidencias de que la SAT juega un papel esencial en la regulación de la síntesis de cisteína y asimilación de SO_4 (Blaszczyk et al., 1999; Harmas et al., 2000; Höfgen et al., 2001; Nikiforova et al., 2002), dado que una sobreexpresión de OAS-TL no afecta al contenido en cisteína de la planta (Saito et al., 2004). Los valores observados para ambas

enzimas (Tabla 3.1), revelan un incremento en la actividad con un aumento en la dosis aplicadas para ambas formas de Se, encontrando los máximos valores en 120 μM (Tabla 3.1). Además, en este estudio, observamos diferencias significativas tanto entre las diferentes dosis como entre las distintas formas de Se aplicadas. Nuestros datos indican que la aplicación de selenito a dosis superiores o iguales a 60 μM produce un mayor incremento en la actividad de ambas enzimas en comparación a la actividad cuando se aplicó selenato (Tabla 3.1). Estos valores nos sugieren que la aplicación de una forma u otra de Se influye en las actividades enzimáticas implicadas en la formación de cisteína, y de este modo, la adición de selenito a elevadas dosis estimulo fuertemente la actividad de SAT y OAS-TL, lo que sugiere una mayor incorporación del selenito a Se-cisteína.

Tabla 3.1 Actividad de las enzimas del metabolismo del S en plantas de lechuga sujetas a diferentes concentraciones y formas de Se. Los datos son medias \pm error estándar (n=9)

Tratamientos	SAT		OAS-TL	
	SeO ₃	SeO ₄	SeO ₃	SeO ₄
Dosis (μM)				
0	14,16 \pm 0,33	14,16 \pm 0,33	109,68 \pm 3,12	109,68 \pm 3,12
5	17,88 \pm 0,38	17,46 \pm 0,29	105,23 \pm 3,21	116,28 \pm 3,72
10	17,30 \pm 0,36	18,25 \pm 0,28	127,84 \pm 3,77	115,25 \pm 4,04
20	20,40 \pm 0,43	20,76 \pm 0,36	116,92 \pm 3,46	117,44 \pm 3,88
40	21,32 \pm 0,42	19,72 \pm 0,33	110,88 \pm 3,18	114,46 \pm 3,54
60	23,14 \pm 0,40	17,14 \pm 0,30	132,66 \pm 3,91	112,42 \pm 3,28
80	27,37 \pm 0,49	22,15 \pm 0,41	165,01 \pm 5,31	131,84 \pm 4,11
120	36,69 \pm 0,62	24,03 \pm 0,48	186,80 \pm 7,12	147,69 \pm 4,37
P-value	***	***	***	***
LSD	1,87	1,12	15,87	11,24
Análisis de la Varianza				
Formas de Se (F)	***		***	
Dosis Se (D)	***		***	
FxD	***		***	
LSD	1,42		15,30	

Las actividades enzimáticas de la SAT y la OAS-TL fueron expresadas como: mg cisteína g⁻¹ p.f. min⁻¹. Los niveles de significación están representados por: * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, y n.s, no significativo.

La formación de cisteína como un producto final en la asimilación del S y su posterior incorporación a proteínas u otros compuesto organosulfurados puede regular este proceso fisiológico (Lappartient et al., 1999; Leustek et al., 1999; White et al., 2004). En la Tabla 3.2 se presentan los resultados de las concentraciones foliares de cisteína y tioles totales, mostrándose un descenso en los valores de ambos compuestos cuando se incremento la concentración de selenito añadida, presentándose el menor valor a la dosis de 120 μM (Tabla 3.2). Sin embargo, la tendencia fue contraria cuando la forma aplicada al medio de cultivo fue selenato, existiendo un incremento gradual de los valores de cisteína y tioles totales, alcanzando su máximo en la dosis de 120 μM (Tabla 3.2).

Tabla 3.2 Concentración de cisteína y tioles totales en hojas de lechuga sometidas a distintas formas y dosis de Se. Los datos son medias \pm error estándar (n=9).

Tratamientos	Cisteína		Tioles totales	
	SeO ₃	SeO ₄	SeO ₃	SeO ₄
Dosis (μM)				
0	1,28 \pm 0,13	1,28 \pm 0,13	11,77 \pm 0,59	11,77 \pm 0,59
5	0,94 \pm 0,11	1,51 \pm 0,18	7,25 \pm 0,43	15,86 \pm 0,73
10	0,98 \pm 0,11	1,41 \pm 0,17	8,66 \pm 0,40	15,10 \pm 0,77
20	0,89 \pm 0,12	1,34 \pm 0,17	7,58 \pm 0,49	14,45 \pm 0,74
40	0,56 \pm 0,07	1,81 \pm 0,22	9,60 \pm 0,48	15,38 \pm 0,76
60	0,53 \pm 0,06	1,92 \pm 0,24	8,35 \pm 0,51	17,27 \pm 0,71
80	0,59 \pm 0,07	1,86 \pm 0,20	7,77 \pm 0,45	17,02 \pm 0,70
120	0,48 \pm 0,05	2,17 \pm 0,31	6,70 \pm 0,39	18,72 \pm 0,78
P-value	***	***	***	***
LSD	0,38	0,20	1,14	1,61
Análisis de la Varianza				
Formas de Se (F)	***		***	
Dosis Se (D)	n.s		***	
FxD	***		***	
LSD	0,18		1,30	

Concentración en Cisteína expresado como: mg Cys g⁻¹ p.f.; concentración de tioles totales expresados como: mg Cys g⁻¹p.f. Los niveles de significación están representados por: * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, y n.s, no significativo.

Otros parámetros que pueden ayudarnos a explicar la influencia del selenito y el selenato sobre la asimilación del S son la concentración de aminoácidos y proteínas solubles, dado que la formación de cisteína y su posterior transformación en metionina e incorporación a proteínas es un proceso importante en la regulación del metabolismo del S (Leustek y Saito 1999). Los resultados para aminoácidos y proteínas están mostrados en la Tabla 3.3, donde estos compuestos nitrogenados incrementan con la dosis de Se aplicada, ya sea en forma de selenito o selenato. Los máximos valores fueron encontrados en la concentración de 120 μM (Tabla 3.3). A pesar de que ambas formas de Se provocaron una elevación de ambos parámetros, el selenito produjo un mayor incremento de estos valores con respecto a la aplicación con selenato, principalmente a partir de la dosis de 20 μM (Tabla 3.3).

Tabla 3.3 Concentración en aminoácidos y proteínas totales en hojas de lechuga bajo diferentes formas y dosis de Se. Los datos son medias \pm error estándar (n=9).

Tratamientos	Aminoácidos		Proteínas	
	SeO ₃	SeO ₄	SeO ₃	SeO ₄
Dosis (μ M)				
0	0,44 \pm 0,07	0,44 \pm 0,07	1,99 \pm 0,24	1,99 \pm 0,24
5	0,57 \pm 0,08	0,50 \pm 0,09	2,30 \pm 0,32	2,79 \pm 0,30
10	0,56 \pm 0,07	0,63 \pm 0,11	2,32 \pm 0,35	2,80 \pm 0,32
20	0,86 \pm 0,09	0,63 \pm 0,15	2,33 \pm 0,28	2,80 \pm 0,30
40	0,81 \pm 0,09	0,59 \pm 0,12	3,04 \pm 0,31	2,78 \pm 0,29
60	1,02 \pm 0,08	0,67 \pm 0,13	3,09 \pm 0,30	2,82 \pm 0,35
80	1,02 \pm 0,10	0,68 \pm 0,16	3,17 \pm 0,29	2,84 \pm 0,34
120	1,07 \pm 0,09	0,77 \pm 0,17	3,96 \pm 0,33	2,83 \pm 0,31
P-value	***	***	***	***
LSD	0,28	0,16	0,41	0,26
Análisis de la Varianza				
Formas de Se (F)		***		***
Dosis Se (D)		***		***
FxD		***		***
LSD		0,15		0,34

Concentración en aminoácidos expresados como: mg Gly g⁻¹p.f.; concentración en proteínas expresadas como: mg albúmina g⁻¹ p.f.

Los niveles de significación están representados por: * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, y n.s, no significativo.

Estos resultados podrían explicar porque el selenato provocó en nuestro trabajo menos fototoxicidad que el selenito (*véase en el capítulo 2. Producción de biomasa aérea, peroxidación de lípidos y oxidación de proteínas*). La aplicación de selenito como hemos podido comprobar produce un aumento importante de las concentraciones de cisteína, aminoácidos y proteínas, lo que hace suponer que la concentración de Se-cisteína es mayor cuando aplicamos selenito que cuando aplicamos selenato. La mayor concentración posiblemente de Se-cisteína en las plantas tratadas con selenito supondría también posiblemente su mayor incorporación a proteínas lo que alteraría la configuración de estas y por tanto la pérdida de funcionalidad apareciendo así

síntomas de fototoxicidad (Anderson, 1993). Además, el hecho de que el selenato induzca una mayor síntesis y acumulación en los niveles de tioles totales que el selenito puede representar un beneficio para las plantas, por dos razones: (i) posiblemente se produzca una menor incorporación de Se-cisteína a proteínas ya que esta cisteína también es utilizada para la formación de compuestos organosulfurados no proteicos. (ii) Entre los compuestos organosulfatados no proteicos, es importante decir que existen tanto vitaminas y cofactores como biomoléculas antioxidantes importantes como el glutatión (Droux, 2004; Saito, 2004). El glutatión (GSH) es el principal reservorio de azufre reducido no proteico, y tiene una función crucial en la defensa y protección de la célula. Además de ser uno de los principales antioxidantes vegetales, eliminando ROS. El GSH protege a las proteínas frente a la desnaturalización causada por la oxidación de los grupos tioles de éstas durante el estrés (Noctor et al. 2002).

3.4. Conclusión

En resumen, en este capítulo confirmamos que la forma y rango de aplicación de Se afecta a la asimilación del S y fundamentalmente a los productos finales de dicho metabolismo, el cual tiene repercusiones sobre el crecimiento y por consiguiente sobre la efectividad de los programas de biofortificación con este elemento traza. Así, rangos de aplicación superiores a 10 μM de selenito causan mayor formación de cisteína, incluyendo probablemente Se-cisteína, que puede ser usada en la formación de proteínas las cuales no sería funcionales, induciendo una mayor fitotoxicidad y por lo tanto un menor crecimiento de la planta. Por el contrario, con la aplicación de selenato, la cisteína es usada principalmente en la formación de compuesto organosulfatados (ej. glutatión), los cuales pueden reducir el efecto tóxico de este elemento. Además de incrementar la concentración de S foliar, la aplicación de esta forma indica que podría existir una menor cantidad de cisteína en forma de Se-cisteína. Esto mejoraría los programas de biofortificación que usan Se aplicado en forma de selenato, ya que reduciría el efecto fitotóxico de este elemento traza.

Capítulo 4
Producción y detoxificación de
H₂O₂ en plantas de lechuga
sometidas a Se

4.1. Introducción

Las plantas cultivadas, en menor medida, y no cultivadas están sometidas a diferentes situaciones provocadas por las peculiaridades del clima donde se encuentran. La peculiaridad de éste tiene importantes repercusiones en el funcionamiento de las plantas ya que en la mayoría de los casos son situaciones desfavorables para el desarrollo de las mismas. Estas condiciones, en el ámbito de la fisiología vegetal, son englobadas bajo el término de estrés; definido por Levitt (1980) como “cualquier factor ambiental potencialmente desfavorable para los organismos vivos”. Posteriormente Larcher (1987) lo describió más concretamente como “un estado en el que las crecientes demandas hechas a una planta conducen a una desestabilización de funciones, seguida por la normalización y por una resistencia mejorada, si los límites de la tolerancia son excedidos y se sobrepasa la capacidad adaptativa, el resultado puede ser el daño permanente o incluso la muerte”.

Podemos definir dos tipos de estreses que afectan al funcionamiento de las plantas:

- a) Estrés biótico, incluye todos aquellos estreses provocados por los organismos vivos, como animales; incluyendo los provocados por el hombre (fuegos, polución, malas prácticas agrarias...etc.), microorganismos y otras plantas.
- b) Estrés abiótico, incluye la gran mayoría de los factores climáticos que ejercen sus efectos en la atmósfera, el suelo y el agua. Así, podemos definir los diferentes estreses abióticos como: térmico, lumínico y nutricional.

La principal consecuencia de la presencia de estos tipos de estrés sobre las plantas es el aumento de la formación de ROS. Estas formas de oxígeno se producen de forma normal en la célula como consecuencia del metabolismo aerobio y como subproductos de procesos redox, principalmente en la fotosíntesis y en la cadena electrónica de la membrana mitocondrial (Nagrathna et al., 1993; Asada, 1994; Smith-Becker et al., 1998).

lípidos, dañar el ADN, proteínas y moléculas pequeñas. Fenton en 1894, describió la oxidación del H_2O_2 con sales de hierro, siendo descrito posteriormente por Haber y Weiss en 1934, el radical hidroxilo como el oxidante en esta reacción (Arora et al., 2002). En los sistemas biológicos la capacidad de reducir hierro puede ser una reacción limitante, pero el ión férrico puede ser reciclado a ión ferroso por la reducción de agentes como $\cdot O_2^-$. La reacción en conjunto por la que se produce el radical hidroxilo a partir de $\cdot O_2^-$ y H_2O_2 en presencia de elementos traza como el ión Fe y Cu es llamada reacción de Haber-Weiss (Halliwell y Gutteridge, 1989; Arora et al., 2002).

- *Peróxido de hidrógeno (H_2O_2).*

El peróxido de hidrógeno, en su mayoría, procede de la reacción del O_2 durante la respiración y de la actuación de las superóxido dismutasas (Cadenas, 1989; Halliwell y Guteridge, 1989). Es uno de los ROS menos tóxicos, ya que no es un agente oxidante fuerte y su reactividad con moléculas biológicas es relativamente baja en ausencia de metales (Eltner, 1987). Aunque es considerado como la principal causa de la disminución de la biomasa foliar en la mayoría de los cultivos sometidos a algún tipo de estrés (Queiroz et al., 1998). Por otro lado, el H_2O_2 desempeña algunas funciones positivas en las células como metabolito en diferentes metabolismos de las células vegetales (Scandalios y Alexios, 1999).

- *El oxígeno singlete (1O_2).*

Mediante excitación, el oxígeno, ya sea en su forma básica o como en estado de triplete, puede ser transformado al estado singlete. Se genera durante la peroxidación de lípidos, aunque su fuente de producción primaria son las clorofilas bajo condiciones de elevadas intensidades lumínicas, baja concentración de CO_2 , el desplazamiento del transporte electrónico fotosintético y en presencia de inhibidores del transporte electrónico. El 1O_2 es una forma energizada de O_2 altamente destructiva, pues su ataque es indiscriminado y dirigido a los lugares cargados de electrones, como es el caso de la histidina, triptófano y metionina (Loewen et al., 1993). Además, es capaz

de atacar el ADN y provocar la peroxidación de lípidos, dando lugar a la destrucción de las membranas biológicas (Whitelegge et al., 1995).

Con el fin de evitar los daños tóxicos producidos por la generación de ROSS ante un estrés las plantas han desarrollado una serie de defensas, siendo uno de los más importantes el demonizado como metabolismo oxidativo (Shanker, 2005). El metabolismo oxidativo consta de un complejo sistema enzimático capaz de eliminar las especies reactivas de oxígeno. Las enzimas capaces de dextoxificar ROS son la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la ascorbato peroxidasa (APX) y las enzimas que constituyen el ciclo ascorbato/glutatión o ruta de Halliwell-Asada (Halliwell y Gutteridge, 1989).

- *Superóxido dismutasa (SODs).*

Son metaloenzimas que llevan a cabo la eliminación específica y eficiente del radical $\cdot\text{O}_2^-$ mediante la catálisis y dismutación de este radical en H₂O₂ y O₂, a través de una oxidación y reducción del metal unido al complejo enzimático. Esta enzima es la única cuya actividad determina la concentración de $\cdot\text{O}_2^-$ y de H₂O₂ en las células, constituyendo, por tanto la primera línea de defensa celular (Halliwell y Gutteridge, 1989).

- *Catalasas (CATs).*

Son las enzimas encargadas de la eliminación del H₂O₂ formado, bien por la actividad de la SOD o por la oxidación del $\cdot\text{OH}$ (del Río et al., 1991). Se encuentran presentes en los peroxisomas principalmente en elevadas concentraciones debido al H₂O₂ producido en la fotorespiración (del Río et al., 1992). Su actividad es estimulada por los monofenoles y por el Mn⁺⁺, degradando el H₂O₂ en H₂O y O₂ en el sitio de formación del mismo evitando así su efecto dañino (Van Camp, 1994). A pesar de su baja afinidad por el sustrato, lo que hace que requiera de elevadas concentraciones para llevar a cabo su correcta eliminación (Creissen y Malamy, 1994), un aumento del H₂O₂ hasta niveles saturantes inhibe su actividad (Klessig et al., 1994).

- Ascorbato peroxidas (APX).

La APX es la principal enzima del ciclo ascorbato/glutati3n y desempeña un papel fundamental dentro del mismo (Asada y Takahashi, 1987), ya que elimina H₂O₂ mediante la oxidaci3n del ascorbato que se transforma en monodehidroascorbato (Rosales et al., 2006). Posee una alta afinidad por el 3cido asc3rbico y un rango de pH muy estrecho (Foyer et al., 1994). La expresi3n de los genes APX es r3pidamente inducida por varias condiciones de estr3s, lo que sugiere un importante papel en dicho metabolismo (Mittler y Zilinskas, 1991).

- Glutati3n peroxidasa (GSH-Px).

La GSH-Px es una peroxidasa que podemos encontrar en los cloroplastos de las c3lulas vegetales. Aunque es muy conocida en humanos, hasta hace pocos aros no se ha descubierto en las plantas superiores, a pesar de que su actividad si fue demostrada por Shigeoka et al. (1991), quienes tras purificar la GSH-Px en *Chlamydomonas*, observaron que 3sta es muy similar a la caracterizada en humanos. Su funci3n es similar a la APX, aunque utiliza como dador de electrones el GSH (Hartikainen et al. 2000). Aun se desconoce si es una selenoprote3na en vegetales al igual que en mam3feros y los trabajos m3s recientes sugieren que el Se induce su actividad, a pesar de esto, actualmente no se ha demostrado que sea selenodependiente en plantas.

- Enzimas del ciclo ascorbato/glutati3n.

Para mantener el sistema de eliminaci3n de H₂O₂ en los cloroplastos, la regeneraci3n del ascorbato se lleva a cabo principalmente a partir de dehidroascorbato (DHA), mediante la enzima dehidroascorbato reductasa (DHAR) y en menor medida a partir del monodehidroascorbato (MDHA) por la monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) (Rosales et al. 2006). La DHAR se localiza en el estroma de los cloroplastos y opera junto al GSH como dador de electrones en la reducci3n del DHA. Por otro lado, el GSH, es el dador de

e⁻ tanto para la regeneración del ascorbato como para la detoxificación del H₂O₂ por la enzima GSH-PX y por tanto debe ser posteriormente regenerado, siendo reducido por la enzima glutatión reductasa (GR), la cual opera reduciendo el glutatión oxidado (GSSG) con el NADPH como donador de electrones (Creissen et al., 1996). Teniendo la GR una función reguladora, ya que su actividad depende de la disponibilidad de NADPH celular (Smith et al., 1989).

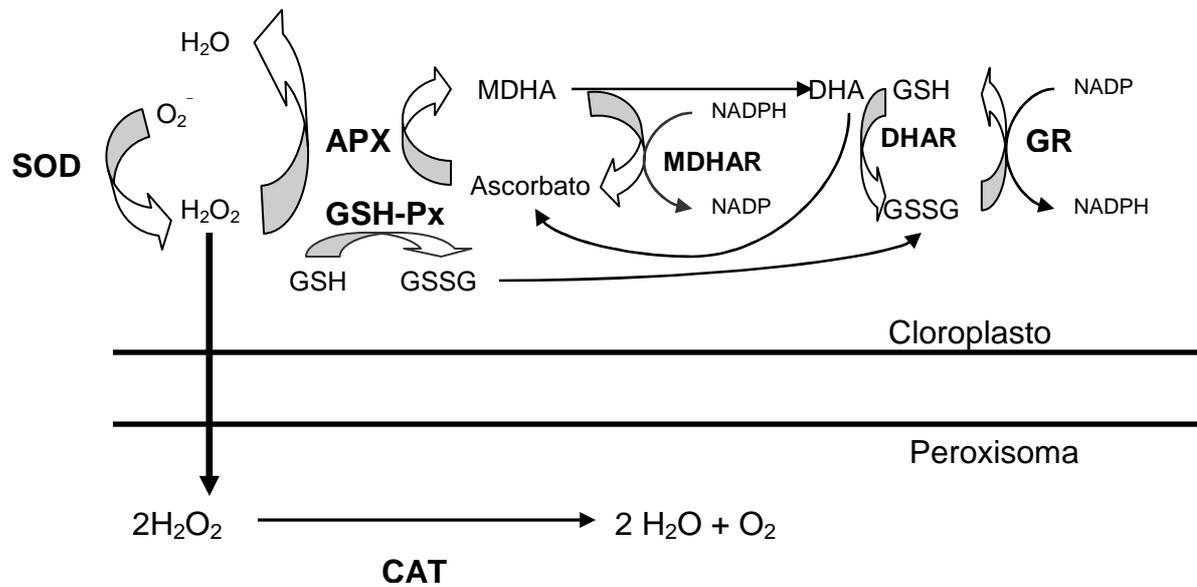


Imagen 4.2: Esquema de la detoxificación de las distintas formas de Ros. Ciclo de Halliwell-Asada.

En la última década, algunos trabajos reflejan la interacción de algunos elementos traza, como el Se, en una mejora del funcionamiento del metabolismo bajo distintas condiciones de estrés. Trabajos como los de Hartikainen et al. (2000); en plantas de centeno, nos sugieren varios efectos beneficiosos del Se en estas plantas, entre los cuales incluye propiedades antioxidantes que pueden estimular el crecimiento, retrasando la senescencia (Djanaguiraman et al., 2005), por otro lado algunos estudios apuntan que este elemento le puede conferir a la planta protección frente a algunos insectos (Hanson et al., 2004), hongos y herbivoría (Hanson et al., 2003), además de aumentar la resistencia a distintos estreses abióticos (Hartikainen y Xue, 1999).

El efecto beneficioso del Se en plantas sometidas en condiciones de estrés ha sido en la mayoría de los casos atribuido al incremento de la actividad antioxidante. Así, Xue et al. (2001) y posteriormente Djanaguiraman et al. (2005), observaron la influencia de la aplicación de Se en forma de selenato sobre la senescencia en plantas de lechuga y soja, comprobando que el descenso en la actividad de las enzimas antioxidantes era inferior en las plantas tratadas con este elemento, lo que disminuía el daño oxidativo incrementando el crecimiento en las plantas tratadas con Se.

Kong et al. (2005) analizaron la respuesta de la aplicación de selenato en las plantas de acedera sometidas a un estrés salino, encontrando un incremento de las enzimas antioxidantes (POD y SOD) y además una mejora en la integridad de las membranas plasmática, mitocondrial y cloroplástica. Estos datos por lo tanto además de sugerir una función antioxidante del Se define a este elemento como un potenciador de la capacidad osmótica, por su papel en el mantenimiento de las membranas celulares.

Últimamente, además se ha comprobado un efecto beneficioso del Se sobre la toxicidad provocada por metales pesados. Pedrero et al. (2008) estudian la respuesta de plantas de brócoli sometidas a toxicidad por Cd junto a la aplicación de Se. En este estudio se observa que la aplicación de Se produjo un descenso en el contenido de MDA y un descenso de la translocación de Cd hacia las hojas de la planta disminuyendo así el estrés oxidativo provocado por este metal pesado.

El aumento de la actividad antioxidante por la aplicación de Se ha sido relacionado por varios autores por su posible acción sobre la enzima GSH-Px. Aunque, y al contrario que ocurre en células animales, todavía hoy en plantas no se ha podido demostrar la existencia de una GSH-Px selenodependiente si parece ser que la actividad de esta enzima podría estar influida por la presencia de Se. Pruebas de esta influencia son por ejemplo la existencia de varios trabajos como el de Shigeoka et al. (1991), quienes tras purificar la GSH-Px en el alga *Chlamydomonas* observan que esta es muy similar a la caracterizada en humanos. Posteriormente Takeda et al. (1997), demuestran

en esta misma alga que el H₂O₂ era eliminado principalmente por la enzima APX en ausencia de Se, sin embargo cuando se le aplicaba este elemento traza el H₂O₂ era detoxificado principalmente por la GSH-Px. Finalmente, trabajos en plantas superiores como los realizados por Hartikainen et al. (1997) y (2000) otorgan un papel antioxidante al Se a bajas concentraciones por el poder inductor de la GSH-Px.

Sin embargo, y además de la GSH-Px, existen otras enzimas que también pueden ser influidas por el Se como la SOD, que es parte integral en el metabolismo oxidativo y cuya función es la de transformar el radical superóxido en H₂O₂. A este respecto, Kong et al. (2005), en plantas de acedera sometidas a un estrés salino encuentran un incremento de la actividad SOD. Por el contrario, y en el mismo trabajo los autores no observan el mismo comportamiento para el enzima CAT, puesto que no se ve afectada por la presencia o no de dicho elemento (Kong et al., 2005).

En definitiva, el efecto del Se incrementando la actividad antioxidante ha sido descrito básicamente en plantas sometidas a algún tipo de estrés, mientras que la posible acción de este elemento traza (tanto diferentes dosis como formas selenato vs. Selenito) sobre el metabolismo oxidativo en plantas no estresadas esta muy poco documentado en la bibliografía existente. De los escasos trabajos a este respecto destacar el realizado por Cartes et al. (2005). En este trabajo los autores observaron que la peroxidación de lípidos era más dependiente de la concentración aérea de Se que de la forma (selenito o selenato) en plantas de centeno. En este estudio, la concentración de Se fue significativamente superior en los tratamientos con selenato que con selenito, y por tanto el efecto pro-oxidante del Se, solo fue detectado en las plantas tratadas con selenato. Recientemente, Gomes-Junior et al. (2007) observan en células de café en suspensión que la aplicación de selenito a bajas concentraciones (0.05 mM) produce peroxidación de lípidos y alteraciones en las enzimas antioxidantes incluyendo una reducción severa en la actividad de la enzima APX.

Este tipo de trabajos que acabamos de describir son de gran importancia en la actualidad si tenemos en cuenta que la importancia del Se en la nutrición de los mamíferos es primordial, ya que una deficiencia en este elemento puede promover cáncer (Diwadkar-Navsariwala et al., 2006). Una dieta deficiente en Se en humanos es causada por una ingestión de vegetales con una imperceptible concentración de Se, debido a su baja biodisponibilidad en la mayoría de los suelos agrícolas (Smorklji et al., 2005; Pedrero et al., 2006). Por tanto, dada esta baja biodisponibilidad y el papel de las plantas como principal fuente de este elemento en la dieta, muchos estudios han aparecido recientemente acerca de técnicas para incrementar el contenido en Se en plantas usadas para el consumo humano a través de los denominados programas de biofortificación.

Así, el principal objetivo de este trabajo fue estudiar en plantas no estresadas la influencia del Se aplicado a diferentes dosis y formas (selenito vs. selenato) sobre la formación y detoxificación del H₂O₂. Aquí comprobamos que el efecto del Se sobre la formación y detoxificación de H₂O₂ depende en gran medida de la forma en que este elemento traza es aplicado al medio de cultivo.

4.2. Material y Métodos

Los apartados correspondientes a material vegetal y condiciones de crecimiento, muestreo vegetal y análisis estadístico fueron similares a los descritos en el capítulo 2 (*véase en material y métodos, capítulo 2 (2.2)*).

Análisis de las plantas

4.2.1. Concentración de peróxido de hidrógeno

La extracción y cuantificación del H₂O₂, se realizó siguiendo el método de Mukherjee y Choudhuri (1983), se basa en el complejo que forma el H₂O₂ al reaccionar con el titanio (Ti⁴⁺).

Para la medida se homogeneizó 1 g de material vegetal fresco en 10 ml de acetona muy fría. Este homogeneizado se filtró y se centrifugó a 3500 rpm durante 5 min. Del sobrenadante se tomó 1 ml y se le añadió 0,2 ml de TiCl₄ al 20% disuelto en HCl 2M, y 1 ml de NH₄OH. Seguidamente se agitaron los tubos y se centrifugaron a 3500 rpm durante 5 min. El sobrenadante obtenido se desechó y se realizó tres lavados del pellet con acetona. Posteriormente se añadimos 4 ml de H₂SO₄ 2M y resuspendimos el pellet en destilada y se incubó durante 15 min. Añadimos 3 ml de H₂O y filtramos en embudos de papel de filtro. Posteriormente se midió por espectrometría a una longitud de onda de 415 nm frente a una curva patrón de H₂O₂.

4.2.2. *Concentración del glutatión total*

El glutatión total fue determinado siguiendo la metodología empleada por Gossett et al. (1994). La extracción se llevó a cabo mediante homogenización de 1 g de material vegetal fresco en 5 ml ácido metafosfórico 5%. El homogeneizado se centrifugó a 13500 rpm durante 15 min. Posteriormente se realizó la mezcla de reacción consistente en: 0,05 ml de extracto, 0,25 ml de tampón Heppes-HCl 50 mM pH 7,6; que contiene 330 mM de betaína; y por último 0,15 ml de ácido sulfosalicílico al 10 %. Posteriormente, en un tubo de ensayo se adicionaron 0,15 ml de la mezcla de reacción anterior, 0,7 ml de NADPH 0,3 mM, 0,1 ml de 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DNTB) 6 mM y 0,05 de GR (10 U/mL). Finalmente se procedió a la lectura de las muestras a 412 nm, frente a una curva estándar de glutatión disuelto en ácido metafosfórico al 5%.

Enzimas antioxidantes

4.2.3. *Determinación de la actividad Superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1)*

La extracción y cuantificación de la enzima SOD se realizó siguiendo el método de Giannopolitis y Ries (1977) y Beber y Fridovich (1987) con algunas modificaciones propuestas por Yu et al. (1998). La actividad SOD, fue determinada mediante la inhibición de la reducción fotoquímica del azul de

nitrotetrazolio (NTB). Para su determinación 0,5 g de material fresco fueron homogenizados en 5 ml de tampón Eles-HCl 50 mM pH 7,6; se filtró y centrifugó a 11000 rpm durante 10 min. El sobrenadante obtenido se diluyó en una proporción 1:5 con el tampón de maceración. Posteriormente colocamos tres grupos diferentes de tubos de ensayo: blanco, control y muestras. El blanco se realizó mediante la adicción de 5 ml de tampón de reacción consistente en: tampón CO₃Na₂-CO₃HNa 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 tampón de maceración. Los tubos control, se realizaron uno por cada muestra, consistentes en 0,1 ml de extracto enzimático y 5 ml de tampón de reacción. Los tubos de las muestras problema, se añadió 0,1 ml de extracto enzimático y 5 ml de tampón de reacción.

Todos los tubos se agitaron y se guardaron en oscuridad. A continuación se procede a la lectura de estos tubos a una longitud de onda de 560 nm. Posteriormente los tubos blanco y muestras son iluminados durante 15 min. con una intensidad lumínica de 380 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Transcurridos los 15 min., se midieron de nuevo todos los tubos por espectrofotometría a 560 nm según el siguiente orden: en primer lugar se midieron en el los blanco, luego el control de la muestra y por último los tubos problema.

4.2.4. *Determinación de la actividad Catalasa (EC 1.11.1.6)*

La determinación de la actividad de la catalasa se llevó a cabo mediante el método descrito por Rao et al. (1997); y esta basado en la cantidad de H₂O₂ oxidada por la actividad de la enzima a lo largo del tiempo. Para la extracción de esta enzima se homogenizó 0,5 g de material vegetal fresco en 5 ml de tampón Hepes-HCl 25 mM pH 7,8 con PVPP al 10%. El homogeneizado se filtró y centrifugó a 11500 rpm durante 20 min. Posteriormente se mezcló en tubos de ensayo: 0,75 ml de tampón Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 25 mM pH 7, 0,75 ml de EDTA-Na₂ 0,8 mM, 1ml de H₂O₂ y 0,5 ml de extracto enzimático. La actividad se establece siguiendo el cambio de absorbancia a una longitud de onda de 240 nm durante 3 min. Usando para el cálculo un coeficiente de extinción molar de 40 mM⁻¹cm⁻¹.

4.2.5. *Determinación de la actividad Ascorbato Peroxidasa (EC 1.11.1.11)*

La determinación de la APX se realizó mediante el método descrito por Rao et al. (1996), basado en la disminución de NADPH producido por la actividad de dicha enzima. Se homogenizó 0,5 g de material vegetal fresco en 5 ml de tampón K₂HPO₄-KH₂PO₄ 100 mM pH 7,5; que contiene 1 mM de EDTA-Na₂. A continuación se filtró y centrifugó durante 20 min. a 12000 rpm. Para la determinación se adicionó a los tubos de ensayo, 1,5 ml de tampón K₂HPO₄-KH₂PO₄ 100 mM pH 7,5, 0,75 ml de H₂O₂ 0,2 mM, 0,75 ml de extracto enzimático, 0,75 ml de ascorbato-Na 0,5 mM. Se agitó y se midió la disminución de absorbancia a 290 nm durante 3 min, utilizando un coeficiente de correlación molar de: 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹.

4.2.6. *Determinación de la actividad Glutación Peroxidasa (EC 1.11.1.9)*

La actividad de la GSH-Px 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 tampón KNaHPO₄, pH 7,0, y tras una centrifugación a 3000 rpm durante 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, 0,067M. El tubo control se realizó de la misma manera, simplemente sustituyendo el extracto enzimático por tampón de maceración. Después de un precalentamiento en un baño a 25 °C durante 5 min se adicionó 0,2 ml de H₂O₂ 1,3 mM, iniciándose así la reacción. Transcurridos 10 min a temperatura ambiente, se paró la reacción mediante la adición de 1 ml de ácido tricloroacético al 1%, y la mezcla se introdujo en un baño de hielo durante 30 min. Entonces fue centrifugada durante 10 min. a 3000 rpm. Del sobrenadante obtenido se tomaron 0,48 ml y se mezclaron con 2,2 ml de 0,32 M Na₂HPO₄ y 0,32 ml de 1 mM DNTB desarrollándose el color. La absorbancia es medida a 412 nm en un tiempo máximo de 5 min. La actividad de la enzima fue calculada por el decrecimiento en GSH respecto al tubo control.

4.3. Resultados y Discusión

El Se a pesar de no ser un elemento esencial es absorbido y acumulado por las plantas, como se muestra en la Fig 2.2 (*véase en capítulo*), donde observamos que la concentración de Se fue incrementada con el aumento de la aplicación de dicho elemento traza ($P < 0,001$), presentándose la máximas concentraciones en las dosis de 120 μM para ambas formas de Se aplicadas (Fig. 2.2, *véase en capítulo 2*). Estos datos coinciden con los observados en distintos trabajos previos realizados en distintos vegetales (Hartikainen et al., 1997; Cartes et al., 2005). Además, el estrés afecta negativamente a su crecimiento y desarrollo debido a la generación de ROS que dañan numerosas macromoléculas y estructuras celulares. Como pudimos ver en el capítulo 2 el grado de estrés se midió usando como indicadores la producción en biomasa foliar y la peroxidación de lípidos, mediante la actividad LOX y el contenido en MDA y el contenido en grupos carbonilo (Fu y Huang, 2001; Sairam et al., 2002; Rosales et al., 2006). Nuestros resultados con respecto a la biomasa revelan que existen diferencias significativas dependiendo la forma y dosis aplicadas (Fig. 2.1, *véase en capítulo 2*), presentándose en general un mayor crecimiento cuando añadimos selenato. El valor más elevado para este parámetro fue registrado en las concentraciones 20 μM para el selenato y 5 μM en el caso del selenito (Fig. 2.1, *véase capítulo 2*). Por otro lado, los valores menores de biomasa se encontraron en la dosis de 120 μM para ambas formas de Se aplicado (Fig. 2.1, *véase en capítulo 2*). En general, nos indican que la forma menos fitotóxica es el selenato. Por otro lado, respecto a los indicadores de estrés usados, el Se aumento la actividad LOX y el contenido en MDA y grupos carbonilo (Tabla 2.2, *véase en capítulo 2*), registrándose los máximos valores en el tratamiento de 120 μM , y en las plantas control los valores mínimo (Tabla 2.2, *véase en capítulo 2*). Observándose siempre valores más elevados cuando la aplicación fue en forma de selenito respecto al selenato. Así mismo, los resultados relacionados con los indicadores de toxicidad coinciden con la aparición de una disminución en la biomasa de las plantas (Fig. 2.1 y Tabla 2.2, *véase en capítulo 2*).

Una de las causas de la peroxidación de lípidos es la acumulación de H₂O₂, que al igual que otros ROS, ataca a las membranas lipídicas incrementando así la cantidad de MDA y la actividad LOX (Djanaguiraman et al., 2005). Los datos obtenidos nos muestran un aumento en la concentración de H₂O₂ ($P < 0,001$), a medida que aumentamos las dosis de Se, siendo de nuevo su concentración superior cuando la forma de Se añadida fue selenito (Fig. 4.1). Destacar el efecto diferente que produjeron las formas de Se sobre la concentración de H₂O₂ puesto que cuando aplicamos selenito a una concentración de 20 μM se produjo ya un incremento significativo de la concentración de H₂O₂ respecto a las plantas control, mientras que para el selenato esto no ocurrió hasta la aplicación de la dosis de 120 μM (Fig. 4.1), lo que podría explicar el hecho de que el selenito resulte más fitotóxico que el selenato (Fig. 4.1).

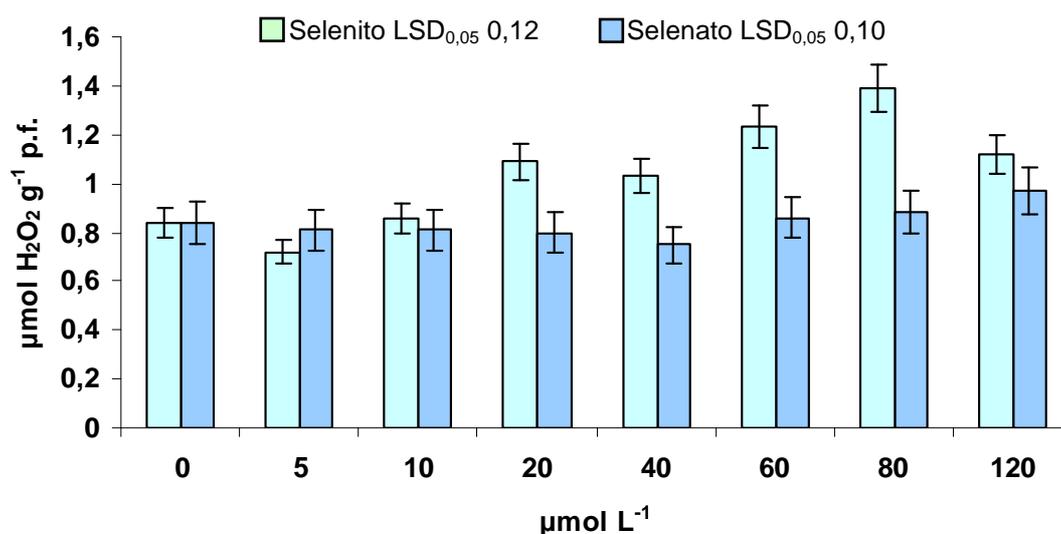


Figura 4.1 Concentración de H₂O₂ en plantas de lechuga sometidas a distintas formas y dosis de Se. Los datos son medias \pm error estándar ($n=9$)

Durante el estrés oxidativo, el exceso en la producción de ROS causa daños en la membrana que eventualmente provocan la muerte celular. Para una protección frente a estos ROS, las plantas contienen enzimas antioxidantes como SOD, CAT, APX y GSH-Px, así como un amplio grupo de compuestos antioxidantes no enzimáticos (Mittler, 2002; Blokhina et al., 2003). En la Figura

4.2 podemos observar los diferentes resultados obtenidos para las actividades enzimáticas encargadas tanto de la formación como detoxificación del H₂O₂. SOD es la enzima encargada de eliminar el radical superóxido y transformarlo en H₂O₂ (Arora et al., 2002).

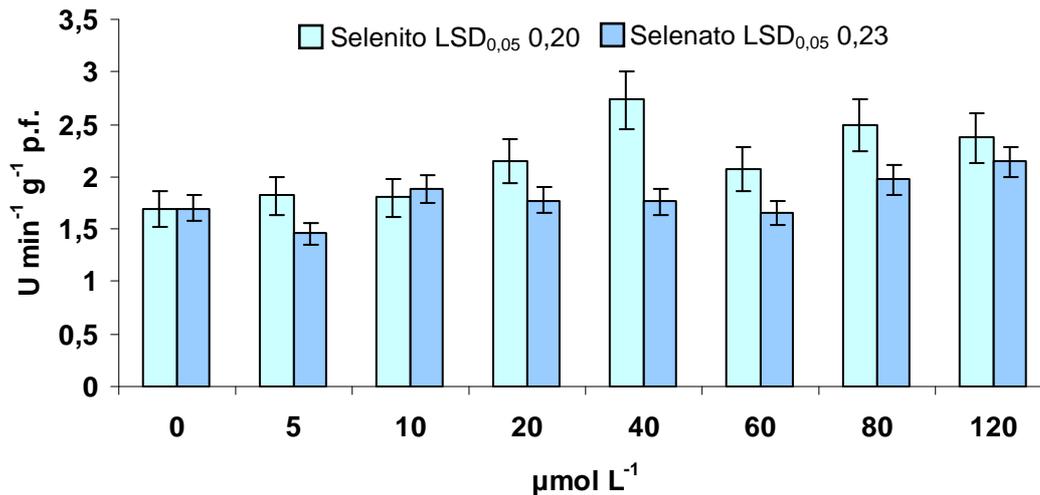


Figura 4.2 Actividad SOD en hojas de lechuga bajo diferentes formas y dosis de Se. Los datos son medias ± error estándar (n=9)

Los datos obtenidos para esta enzima nos muestran un incremento en la actividad a medida que aumentamos las dosis Se, presentándose los máximos valores en los tratamientos de 80 y 120 μM de selenito y de selenato, respectivamente (Fig. 4.2). En general, la aplicación al medio de cultivo de selenito produjo un incremento superior de la actividad SOD respecto a la presentada en plantas control, fundamentalmente a partir de la dosis 20 μM (Fig. 4.2), lo que nos sugiere un mayor estrés oxidativo en estas plantas en comparación con las plantas tratadas con selenato, donde la inducción de la actividad SOD respecto a plantas control ocurrió a partir de la dosis 80 μM (Fig. 4.2). Nuestros resultados son similares a los descritos por Hartikainen et al. (2000) y Djanaguiraman et al. (2005) ya que estos autores observaron un incremento de la actividad SOD en plantas de centeno y soja cuando se aplicó Se en forma de selenato, encontrando al igual que nuestro estudio el máximo de su actividad en las dosis elevadas fitotóxicas.

Tabla 4.1 Actividad de las enzimas encargadas de la formación y detoxificación del H₂O₂ en plantas de lechuga sometidas a distintas formas y dosis de Se. Los datos son medias \pm error estándar (n=9)

Tratamientos	CAT		APX		GSH-Px	
	SeO ₃	SeO ₄	SeO ₃	SeO ₄	SeO ₃	SeO ₄
Dosis (μ M)						
0	21,2 \pm 0,3	21,2 \pm 0,3	101,5 \pm 2,5	101,5 \pm 2,5	0,9 \pm 0,07	0,9 \pm 0,07
5	17,4 \pm 0,3	20,8 \pm 0,3	125,9 \pm 3,1	119,6 \pm 2,6	2,4 \pm 0,16	1,3 \pm 0,11
10	18,5 \pm 0,3	20,1 \pm 0,3	91,5 \pm 2,2	129,5 \pm 2,7	2,1 \pm 0,18	1,4 \pm 0,13
20	20,0 \pm 0,3	29,2 \pm 0,3	90 \pm 2,6	146,6 \pm 3,2	2,6 \pm 0,15	3,0 \pm 0,22
40	17,6 \pm 0,2	28,1 \pm 0,3	79,3 \pm 1,8	143,7 \pm 3,5	2,9 \pm 0,17	2,6 \pm 0,18
60	22,7 \pm 0,2	26,8 \pm 0,3	74,5 \pm 2	136,0 \pm 3,4	3,5 \pm 0,23	3,1 \pm 0,24
80	21,5 \pm 0,2	26,6 \pm 0,3	67,1 \pm 1,7	135,7 \pm 2,9	3,9 \pm 0,27	5,3 \pm 0,37
120	20,7 \pm 0,3	27,5 \pm 0,3	69,9 \pm 2	90,3 \pm 2,8	4,8 \pm 0,32	5,4 \pm 0,41
P-valor	n.s	n.s	***	***	***	***
LSD	8,74	9,21	17,17	19,19	0,89	0,29
Análisis de la Varianza						
Formas de Se (F)	**		***		n.s	
Dosis Se (D)	n.s		***		***	
FxD	n.s		***		***	
LSD	8,01		20,9		0,45	

Actividad CAT expresada como: μ mol H₂O₂ min⁻¹g⁻¹p.f.; Actividad APX expresada como: nmol NADPH min⁻¹ g⁻¹ p.f.; Actividad GSH-Px expresada como: nmol GSH min⁻¹ g⁻¹ p.f.

Los niveles de significación están representados por: * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, y n.s, no significativo.

La enzima CAT se encuentra principalmente en los peroxisomas, transformando el H₂O₂ en agua, aunque su afinidad por el sustrato es menor al de otras enzimas antioxidantes (Arora et al., 2002). Los resultados nos indican que no existen diferencias significativas en su actividad con respecto a las dosis de Se aplicadas (Tabla 4.1), pero si podemos observar que la aplicación de selenato supuso un aumento de esta actividad respecto a las plantas tratadas con selenito para todas las dosis aplicadas (Tabla 4.1). En parte estos datos son similares a los obtenidos por Lingan et al. (2005), que no encontraron

efecto de las dosis de Se sobre la actividad CAT en plantas sometidas a estrés salino. Nuestros resultados nos pueden llevar a pensar que las dosis de Se no influyen sobre la actividad CAT pero si la forma de Se aplicada, lo que sugiere que ante condiciones de estrés la aplicación de selenato sería más beneficiosa que la de selenito. Finalmente, estos resultados nos indican que en presencia de Se la actividad CAT no sería la principal enzima detoxificadora de H₂O₂.

Las enzimas APX y GSH-Px son proteínas cloroplastidiales encargadas de la detoxificación de H₂O₂ en el cloroplasto, producido por la SOD al transformar el ión superóxido producido durante la fotosíntesis (Arora et al., 2002). En general, los valores obtenidos para la enzima APX muestran una mayor actividad cuando la forma aplicada fue selenato, cuyo valor más elevado se presentó en la dosis de 20 µM, y menor en 120 µM superando el resto de los tratamientos la actividad APX de plantas control (Tabla 4.1). Por otro lado, cuando añadimos selenito solo la concentración de 5 µM presentó un valor superior al de las plantas control, observándose la menor actividad en la concentración de 120 µM (Tabla 4.1). Por el contrario, la actividad GSH-Px incrementa a medida que se eleva la dosis de Se aplicada al medio de cultivo, siendo este aumento superior cuando la forma aplicada es selenato (Tabla 4.1). Los resultados obtenidos para GSH-Px coinciden con varios estudios realizados con Se, en los cuales un incremento de este elemento traza aumentaba su actividad (Hartikainen et al., 2000; Xue et al., 2001; Djanaguiraman et al., 2005; Cartes et al., 2005).

En definitiva, la disminución de la actividad APX y la no existencia de variaciones significativas de la actividad CAT respecto al tratamiento control en plantas tratadas con selenito (Tabla 4.1), junto al aumento de la actividad SOD que sufren estas plantas (Fig. 4.2) podría explicar el incremento de la concentración de H₂O₂ y de la peroxidación de lípidos, y por lo tanto de la disminución de la biomasa de la parte aérea (Fig. 2.1, véase en capítulo 2) que se observó tras la aplicación de dosis superiores a 20 µM de selenito. Por el contrario, la aplicación de selenato hasta la dosis de 60 µM además de no inducir variaciones en la actividad SOD (Fig. 2.1), incrementa las actividades APX y GSH-Px (Tabla 4.1) lo que evita el incremento de la concentración foliar

de H₂O₂ y la peroxidación de lípidos (Fig. 4.1 y Tabla 2.2 [véase en capítulo 2]), no generándose por lo tanto una reducción significativa en la biomasa aérea respecto a las plantas control (Fig. 2.1, véase en capítulo 2). Por otro lado, nuestros resultados nos indican que la actividad GSH-Px no tendría un papel esencial en la detoxificación de H₂O₂ al menos en las plantas tratadas con selenito, ya que en estas a pesar de incrementar dicha actividad enzimática (Tabla 4.1) no se produjo una disminución de la concentración foliar de H₂O₂ (Fig. 4.1). Finalmente, indicar que el comportamiento diferente que observamos en nuestro trabajo de la actividad GSH-Px respecto a las enzimas CAT y APX (Tabla 4.1) nos sugiere que la GSH-Px podría definirse como una proteína selenodependiente cuya actividad dependería exclusivamente de la presencia de Se.

Tanto la actividad APX como la GSH-Px requieren de compuestos reducidos para su funcionamiento, dichos compuestos son el ASA y el GSH respectivamente (Arora et al. 2002). Los resultados indican para ambos compuestos que la aplicación de selenato por lo general induce de forma más importante la síntesis y acumulación de estos compuestos antioxidantes (Fig. 2.3 [véase en capítulo 2] y Fig. 4.3, $P < 0,001$ respectivamente). Previamente, como hemos visto en el capítulo 2 (véase Tabla 2.3) se ha observado que la aplicación de Se inducía la síntesis de compuestos antioxidantes tales como los fenoles totales, flavonoides y PPGs en plantas de lechuga, siendo esta inducción superior con la aplicación de la forma selenato. La inducción en la síntesis y acumulación de forma mas importante de distintos compuestos antioxidantes, como el ASA y el GSH, por el selenato también podría justificar por un lado la mayor actividad de las enzimas antioxidantes mencionadas anteriormente, y por otro lado que las plantas tratadas con esta forma de Se presenten un menor estrés oxidativo que las tratadas con selenito.

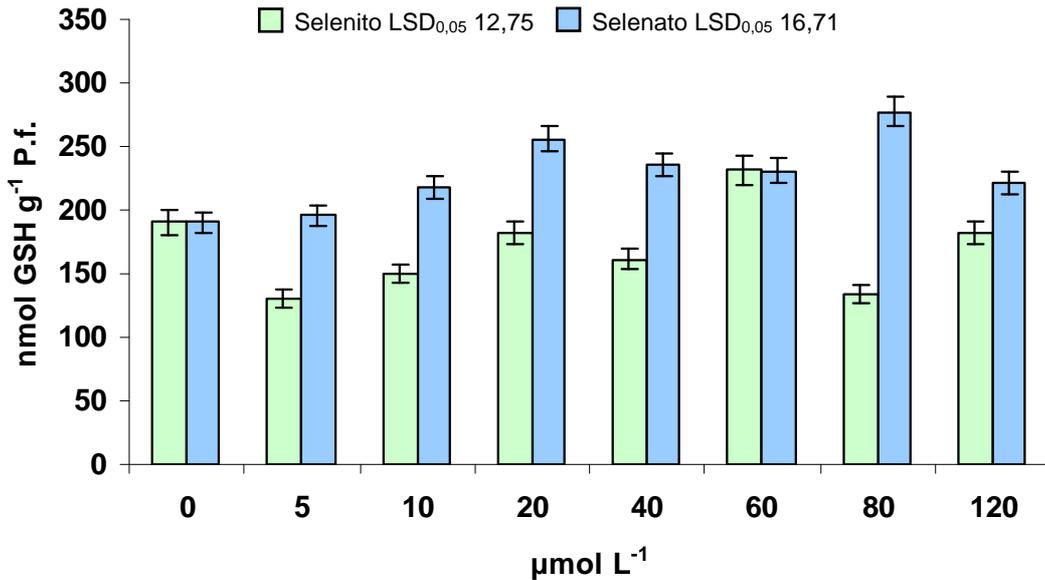


Figura 4.3 Concentración de GSH de las plantas de lechuga tratadas con diferente dosis y formas de Se. Los datos son medias \pm error estándar (n=9)

Los resultados de GSH son muy importantes en este trabajo puesto que nos pueden indicar el grado de asimilación del S, y por lo tanto la posibilidad de toxicidad de Se. De acuerdo con Anderson (1993), el metabolismo del Se sigue la misma ruta que el S, debido a la similitud química de ambos elementos, y por lo tanto muchas de las enzimas involucradas en el metabolismo del S pueden catalizar reacciones análogas con el Se como sustrato, formando Se análogos de compuestos del S que son sustratos de enzimas del S, o reemplazan al S en aminoácidos, y de ese modo, afectar a la capacidad catalítica de estas enzimas, causando la toxicidad de Se en las plantas. Por lo tanto la mayor formación de GSH en plantas tratadas con selenato (Fig. 4.2), podría explicar también porque la aplicación de esta forma de Se resulta menos fitotóxica que la aplicación de selenito en plantas. Posiblemente la mayor incorporación de Se a aminoácidos, especialmente a Se-cisteína en plantas tratadas con selenito podría provocar una alteración en el transporte de e⁻ en la fotosíntesis, dado el papel de la cisteína en este proceso (Leustek et al., 2000), lo que generaría una mayor producción de ROS en estas plantas. Por el contrario, posiblemente la menor formación de Se-cisteína en plantas tratadas con selenato junto con una mayor inducción del sistema antioxidante explicaría la menor producción de ROS y por lo tanto una

menor reducción de la producción de biomasa respecto a las plantas tratadas con selenito.

Sin embargo, y con el fin de confirmar estos resultados, es necesario en el futuro la realización de estudios que se centren en el efecto del Se durante el tiempo de aplicación y la respuesta de las diferentes isoenzimas que componen el sistema antioxidante en plantas.

4.4 Conclusión

En conclusión, podemos indicar que el efecto del Se sobre la formación y detoxificación de H₂O₂ en nuestro trabajo depende en gran medida de la forma en que este elemento traza es aplicado al medio de cultivo. Así, la aplicación de dosis de selenito superiores a 10 µM provocan una disminución de la biomasa aérea lo que se asocia a un aumento de la actividad SOD y una disminución de las enzimas encargadas de la detoxificación del H₂O₂, principalmente APX, que provoca un aumento de la peroxidación de lípidos. Por el contrario, la aplicación de selenato hasta la dosis de 80 µM no supone en nuestro trabajo un aumento de la generación y acumulación de H₂O₂, produciéndose además una inducción significativa del sistema antioxidante (actividades CAT, APX, GSH-Px y concentraciones de total ASA y GSH) respecto a plantas control, lo que podría explicar porque en la bibliografía existente se ha descrito un efecto beneficioso del selenato basado en el aumento de la respuesta antioxidante y por lo tanto de la tolerancia en plantas sometidas a diversos estreses abióticos. Finalmente, y aunque mas estudios hacen falta en este sentido, creemos que nuestros resultados son novedosos ya que podríamos definir la aplicación de selenato a bajas dosis como un tratamiento preventivo de inducción en las plantas del sistema antioxidante lo que ayudaría a mejorar las respuestas de resistencia frente a un estrés.

Capítulo 5
Metabolismo y eficiencia en el uso
del N en plantas de lechuga bajo
la influencia del Se

5.1. Influencia de la aplicación del Se (selenito vs selenato) sobre el metabolismo nitrogenado

5.1.1. Introducción

El Nitrógeno (N) es el nutriente más necesario para las plantas, siendo requerido para un crecimiento óptimo entre un 2-5% de su peso seco y por tanto con cierta frecuencia se convierte en un factor limitante para el desarrollo y crecimiento óptimo de las mismas (Miller y Cramer, 2005). Dependiendo del suelo, las formas de N biodisponibles para las plantas van a variar desde el N molécula (N_2), formas inorgánicas (NO_3^- , NH_4^+ y urea), estructuras orgánicas (aminoácidos), y el NH_3^+ u óxidos de N (NO_x).

Sin embargo, y en la mayoría de los suelos, especialmente los destinados a la agricultura, el NO_3^- , es la forma nitrogenada más abundante, cuya concentración normalmente varía dentro de un rango aproximado de entre 0,5 mM y 10 mM (Hirel et al., 2008). Por el contrario el NH_4^+ se suele encontrar en el suelo a una concentración de 10 a 100 veces menor (Hirel et al., 2008); predominando en los suelos en los que la nitrificación esta inhibida, como por ejemplo en los suelos encharcados.

Por lo general, el NO_3^- potencia de una manera más importante que el NH_4^+ el crecimiento de las plantas, puesto que éstas responden a esta forma nitrogenada alterando su metabolismo e induciendo y activando con mayor intensidad a los genes que intervienen en los procesos de asimilación de N (Mesnard y Ratcliffe, 2005). Estos genes codifican por un lado a transportadores que son capaces de captar el NO_3^- desde el medio exterior, y por otro lado, codifican a todas las enzimas responsables de sintetizar en las células, los compuestos orgánicos nitrogenados (Miller y Cramer, 2005).

Las plantas absorben el N desde el suelo fundamentalmente bajo sus formas inorgánicas: NO_3^- y NH_4^+ (Barneix, 2007), siendo la absorción de NO_3^- el principal factor que determina su posterior asimilación e integración en el metabolismo nitrogenado (Gastal y Lemaire, 2002; Stitt et al., 2002). Por tanto, la mayoría de las plantas exhiben un sistema bifásico para la absorción de NO_3^- , definido como de alta y baja afinidad a la absorción de este anión (Miller y Cramer, 2005). En general ambos sistemas de absorción requieren energía, proveniente de un gradiente de concentración, por medio del funcionamiento de las ATPasa de membranas (Miller y Cramer, 2005). Así, considerando estos dos procesos, se ha propuesto que la absorción de NO_3^- es mediada por un mecanismo simporte $2 \text{H}^+/\text{NO}_3^-$, tanto para los sistemas de alta como los de baja afinidad (Miller y Cramer, 2005).

Las raíces poseen al menos tres sistemas de transporte de NO_3^- cinéticamente distintos (Miller y Cramer, 2005):

- Sistema de transporte constitutivo de alta afinidad inducido rápidamente por la presencia de NO_3^- , y saturable a bajas concentraciones de este en el medio.
- Unos transportadores de alta afinidad que son inducidos entre horas y días después de la exposición a NO_3^- .
- Unos transportadores constitutivos de baja afinidad, los cuales intervienen en la absorción de NO_3^- a partir de concentraciones en el rango de 250 μM hasta 50 mM.

Los dos sistemas de alta afinidad son regulados o inducidos en la respuesta al NO_3^- , y también se ha comprobado su inducción por los NO_2^- (Miller y Cramer, 2005). Estos transportadores de alta afinidad son rápidamente activados por la demanda de NO_3^- de la parte aérea, para posteriormente ser inactivados después de la exposición a este anión (Mesnard y Ratcliffe, 2005). La absorción de NO_3^- es sensible tanto a señales externas como internas. Una de las señales que intervienen activamente en el metabolismo nitrogenado son los aminoácidos, que son definidos como un componente mayoritario como forma nitrogenada del

floema en la mayoría de las plantas, particularmente en aquellas que reducen y asimilan en menor medida los NO_3^- en las raíces, como por ejemplo la mayoría de las plantas anuales (Hirel et al., 2007).

Con respecto a la absorción de NH_4^+ los mecanismos de regulación son muy distintos a los que operan en la absorción de NO_3^- . La captación de NH_4^+ esta influida también por el nivel de carbohidratos de la planta, puesto se ha comprobado que a elevados niveles de estos compuestos se favorece su absorción, debido probablemente a que estos compuestos están enérgicamente enriquecidos (Mengel y Kirkby, 2001). Además la absorción de esta forma de N, no esta influida por la disponibilidad de N en la planta (Hirel et al., 2007), no existiendo una relación directamente proporcional, entre la concentración intracelular de NH_4^+ y su absorción. Sin embargo, y según algunos autores los productos resultantes de la asimilación del NH_4^+ , como los aminoácidos, si podrían estar implicados en su absorción de forma similar a los que ocurre con los NO_3^- (Barneix, 2007).

En cuanto a la asimilación de N, el crecimiento de la planta depende en gran medida de un adecuado aporte en este nutriente formar aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos y otros constituyentes celulares necesarios para su desarrollo (Barneix, 2007). La asimilación de N cuando la forma disponible son los NO_3^- requiere por las plantas la absorción de éstos, su reducción y conversión a NO_2^- y NH_4^+ , y la posterior incorporación del NH_4^+ a compuestos orgánicos (Miller y Cramer, 2005).

Una vez que el NO_3^- ha entrado en las células, es asimilado en el tejido vegetal por el medio de una serie de etapas, en las cuales están implicadas distintas enzimas cuya función describiremos a continuación (Imagen 5.1).

La NR cataliza la reducción de NO_3^- a NO_2^- , como podemos observar en la Imagen 5.1 (Druart et al., 2000). De acuerdo con su especificidad por el donador de e^- , existen dos tipos de NR que pueden ser: una ferredoxina-dependiente, la cual típica en las cianobacterias y bacterias fotosintéticas; y otra NR nucleótido

piridina-dependiente que se encuentra en los organismos eucariotas (Weber y Flugge, 2002).

Las diferencias entre estos dos tipos de NR se basan en sus grupos prostéticos y en sus propiedades físico-químicas. Otra diferencia importante es que mientras la NR ferredoxina-dependiente parece encontrarse exclusivamente en las membranas fotosintéticas, la NR piridina-dependiente es una enzima soluble (Barneix, 2007).

En general, la NR-NAD(P)H es una enzima con un peso molecular que oscila desde 197 a 460 Kdaltons (KDa), compuesta por varias subunidades aparentemente idénticas. En plantas superiores, cada monómero tiene tres dominios funcionales que corresponden a cada uno de sus tres centros redox formados por FAD. Los centros redox transfieren dos e^- desde el NAD(P)H a los NO_3^- lo que facilita la reducción de éstos a NO_2^- . Esta enzima se encuentra en el citoplasma, sea radicular o limbo foliar, hecho que se ha comprobado a través del fraccionamiento celular y técnicas bioquímicas o inmunecito-químicas (Miller y Cramer, 2005).

Los análisis moleculares y genéticos han revelado que la mayoría de las plantas tiene dos o más genes estructurales para la NR. La proteína NR y los ARNm son inducidos por la adición de NO_3^- , y esta inducción es reprimida por la glutamina o la asparagina (Miller y Cramer, 2005). El suministro de sacarosa y la exposición a la luz también aumentan la inducción de la proteína NR y del ARNm, lo que sugiere que la actividad de la NR de las hojas se modula reversiblemente por la luz/oscuridad mediante un mecanismo de desfosforilación (activación)/fosforilación (inactivación).

Una vez reducido el NO_3^- a NO_2^- , son nuevamente reducidos hasta NH_4^+ por la enzima nitrito reductasa (NiR) (Imagen 5.1). Se han descrito dos tipos de NiR, las cuales se definen a partir de un donador específico de e^- : ferredoxina-nitrito reductasa, característica de los organismos fotosintéticos, y NAD(P)H-NiR que se encuentra en los organismos no fotosintéticos. Ambas enzimas catalizan la reducción de NO_2^- a NH_4^+ , lo que implica la transferencia de 6 e^- , al igual que

ocurre en la reducción de N_2 a NH_4^+ catalizada por la nitrogenasa (Weber y Flugge, 2002).

La NiR se localiza en los cloroplastos de las hojas y en los plastidios en las raíces. Tiene un peso molecular de 60 a 70 KDa y esta compuesta por dos grupos prostéticos, uno hemo llamado "sirohaem" y otro un centro 4Fe4S (Siegel y Wilkerson, 1989).

En cuanto a la inducción de la NiR, distintos experimentos han evidenciado que la inducción de esta enzima por los NO_3^- es un evento transcripcional (Barneix, 2007). La adición de asparagina o glutamina al medio de cultivo resulta al igual que la NR en una represión de la inducción de la NiR, mientras que la sacarosa la aumenta (Barneix, 2007).

La glutamina sintetasa (GS) es una enzima clave en la asimilación del NH_4^+ en plantas (Mifflin y Habash, 2002; Stitt et al., 2002). En plantas superiores la GS es una proteína de ocho subunidades con un peso molecular aproximado de 350-400 KDa (Kirby et al., 2006), cuya función es la incorporación del NH_4^+ a una molécula de glutamato dando como resultado una molécula de glutamina, con un gasto de NAD(P)H. En hojas se han identificado dos isoformas de la enzima, la GS1 y la GS2, localizadas en el citoplasma y en el cloroplasto respectivamente, y cuya proporción puede variar en respuesta a distintas condiciones medioambientales o conforme la edad de la planta, así como por la acción de algún tipo de estrés (Kirby et al., 2006).

La glutamato sintetasa (GOGAT) es una enzima clave en las primeras etapas de la asimilación del NH_4^+ en bacterias, algas y en plantas superiores (Stitt et al., 2002; Weber y Flugge, 2002). Las reacciones conjuntas de la GS y de la GOGAT se conocen como el ciclo GS/GOGAT, y son esenciales para la asimilación del NH_4^+ en plantas. Las dos moléculas de glutamato sintetizadas por la actividad GOGAT pueden ser usadas como sustratos de la GS o pueden, a partir de su grupo amino, formar otra serie de derivados nitrogenados (Hodges, 2002).

En las plantas superiores, la GOGAT aparece bajo dos isoformas distintas en función a la fuente reductora que utilicen: la Ferredoxina-GOGAT (Fd-GOGAT) y

la NADH-GOGAT, las cuales difieren en su peso molecular, composición, cinética enzimática y en sus funciones (Kirby et al., 2006).

El papel de la glutamato deshidrogenasa (GDH) en la asimilación del NH_4^+ es todavía hoy motivo de discusión (Mifflin y Habash, 2002). La GDH se localiza principalmente en la mitocondrias de todos los tejidos vegetales estudiados. El número de subunidades por la que está compuesta varía entre 4 y 6, y el peso molecular oscila entre 230 y 300 KDa dependiendo de la especie vegetal (Turano et al., 1996). Esta enzima posee una elevada K_m para el NH_4^+ (aproximadamente 1 mM), es decir, su afinidad por el sustrato es baja cuando la concentración de NH_4^+ es el factor limitante, no produciéndose su saturación.

Actualmente, existen distintos puntos de vista opuestos sobre la función de esta enzima. En primer lugar, Oaks (1994) sugiere que la enzima cataliza la afinación reductiva de 2-oxoglutarato y funciona como una alternativa para el ciclo de la glutamato sintasa (GOGAT) (Barneix, 2007). La segunda alternativa fue presentada por Robinson et al. (1992) es que la enzima cataliza la desaminación oxidativa del glutamato para proveer de esqueletos carbonados al ciclo del ácido cítrico, particularmente bajo condiciones de limitación de carbono. Finalmente, también se ha sugerido que la GDH podría jugar un papel importante en la reasimilación del NH_4^+ bajo condiciones de estrés.

Entre los factores que regulan la actividad de la GDH, quizás el más importante y estudiado hasta ahora es el NH_4^+ , puesto que provoca un aumento en la actividad aminadora de la enzima, mientras que su actividad desaminadora disminuye bruscamente. Por otro lado, azúcares como la sacarosa, glucosa o la fructosa pueden afectar de manera negativa a la actividad de la GDH como han comprobado distintos autores (Weber y Flugge, 2002; Barneix, 2007).

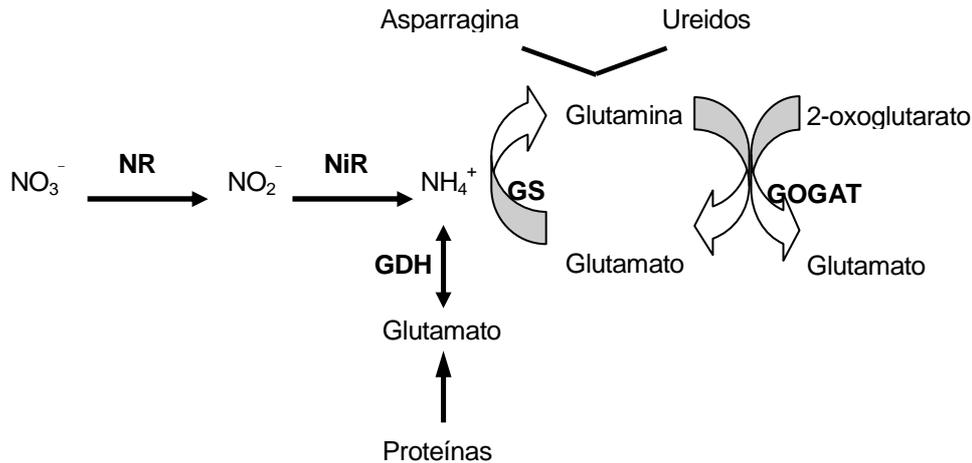


Imagen 5.1: Ciclo de asimilación de los nitratos

Como hemos descrito, el metabolismo del N, es muy importante para el crecimiento y desarrollo de la planta, es por esto, que su regulación es muy importante. Así, la regulación de la asimilación de NO_3^- ha sido y sigue siendo el centro de muchas investigaciones, puesto que resulta de suma importancia en la producción y calidad de los distintos productos agrícolas (Ruiz y Romero, 1998; Ruiz y Romero, 1999). Actualmente se conocen un gran número de factores que pueden afectar directamente a la asimilación de NO_3^- y particularmente la actividad de NR, ya que es considerada tras muchas investigaciones la enzima y etapa limitante del proceso de asimilación de NO_3^- en las plantas superiores (Barneix, 2007; Hirel et al., 2007).

La actividad de dicha enzima puede ser regulada por sus niveles de síntesis y degradación, por la concentración de sustratos y otros factores, y a nivel del suministro intracelular de la enzima (Stitt, 1999). Los factores que pueden influir principalmente en la enzima directamente o a través de señales son: la luz, el oxígeno, el dióxido de carbono, el NO_3^- , el estado nutricional, otros metabolitos y las condiciones ambientales (Barneix, 2007). Los NO_3^- han sido considerados como inductores de la síntesis de la primera enzima de la asimilación, mientras que el NH_4^+ o algún producto resultante de la asimilación, como son los aminoácidos, es considerado como un represor de su síntesis (Solomonson y Baber, 1990).

A pesar de lo mencionado anteriormente, y teniendo en cuenta que actualmente uno de los factores ambientales que pueden afectar la asimilación de N es el contenido en elementos traza en los suelos y aguas de cultivo, derivados bien de la contaminación o bien de la realización de programas de biofortificación con este tipo de elementos como el Fe, Zn, Se y I (Ruiz et al., 2007), existen muy pocos trabajos donde se estudie la relación existente entre el Se y el metabolismo del N.

De las pocas investigaciones al respecto destacar la realizada por Aslam et al. (1990), donde estudian como afecta el Se a la absorción y reducción del NO_3^- , comprobando estos autores una reducción en estos procesos en plantas de cebada tras aplicar el Se en forma de selenito y selenato. Munshi et al. (1990), en tubérculos de patata, mediante la aplicación de Se en forma de selenito, observan un incremento en el contenido en aminoácidos y proteínas en dichos órganos vegetales. Estudios más recientes, como los realizados por Nowak et al. (2002 y 2004) y Ruiz et al. (2007), demuestran como el Se influye, en mayor medida, sobre las enzimas NR y NiR disminuyendo su actividad, y por tanto afectando negativamente al metabolismo del N en general, ya que una disminución en la reducción de NO_3^- , implica una menor actividad de las enzimas del ciclo GS/GOGAT y por consiguiente una disminución en la cantidad de productos finales como aminoácidos y proteínas, que además va a dar lugar a una reducción en el crecimiento de la planta.

En definitiva, y con el fin de desarrollar y estudiar la eficiencia de un programa de biofortificación con Se, y la importancia del N en plantas, especialmente en las de lechuga, donde este nutriente es esencial tanto para la producción de biomasa como para la calidad nutricional, el objetivo de este capítulo será analizar la influencia del Se, bajo distintas formas y dosis, en la asimilación del N.

5.1.2. Material y Métodos

Los apartados correspondientes a material vegetal y condiciones de crecimiento, muestreo vegetal y análisis estadístico fueron similares a los descritos en el capítulo 2 (véase en *material y métodos, capítulo 2 (2.2)*).

Análisis vegetal

Una parte de las hojas muestreadas fue usada en fresco para el análisis de las diferentes actividades enzimáticas del metabolismo: NR, NiR, GS, GOGAT, GDH.

Otra parte de la muestra fue secada mediante liofilización y el peso fue registrado y expresado como gramos de peso seco (p.s.) [parte aérea]⁻¹ (p.a.). Además las muestras liofilizadas fueron utilizadas para determinar las concentraciones de NO₃⁻, NH₄⁺ y N orgánico.

5.1.2.1. Ensayo de la actividad de la NR (EC 1.6.6.1)

El ensayo para la medida de la actividad de la enzima NR, se llevó a cabo siguiendo el método de Mauriño et al. (1986), mediante la homogenización de 1,5 g de material vegetal fresco en 7,5 ml de tampón 100 mM KH₂PO₄-K₂HPO₄, pH 7,5 que contenía 2 mM de EDTA, caseína 1,5% 2mM de DTT y 1% de PVPP. Posteriormente el homogeneizado fue filtrado y centrifugado a 15000 rpm durante 20 min. La cuantificación se realizó siguiendo el método descrito por Debouda et al. (2006). Tomamos 1 ml de sobrenadante al cual adicionamos una mezcla de reacción consistente en 100mM KH₂PO₄-K₂HPO₄ pH 7,5, 100mM NO₃K, 10mM cisterna, 2 mM NADH y 10 mM de MgCl₂. Con un volumen final de 3,4 ml. La mezcla se incubó a 30 °C en oscuridad durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se paró la reacción adicionando 0,2 ml de 1 M Acetato de Zinc. Los tubos se agitaron vigorosamente y se centrifugaron a 2000 rpm durante 15 min. Del sobrenadante obtenido se tomo una alícuota de 0,5 ml a la que se adicionó 1 ml de sulfanilamida al 1% y 1 ml de NNEDA al

0,02 %. Pasados 20 min. se procedió a la lectura de la absorbancia a 540 nm frente a una curva patrón de NO_2^- .

5.1.2.2. *Ensayo de la actividad de la NiR (EC 1.7.7.1)*

El método de extracción para la determinación de la actividad NiR fue la misma que para la NR. Para su cuantificación se realizaron tubos de muestras problemas, 1 control para cada muestra problema, un estándar y 2 blancos, siguiendo el método de Lillo (1984).

Los tubos correspondientes a las muestras problemas consistieron en: 1 ml de 100 mM de tampón $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ pH 7,5, 0,2 ml de 20 mM de NO_2Na , 0,3 ml de 0,3 M de ditionito sódico disuelto en bicarbonato sódico, 0,3 ml de 5 mM de dimetil-viológeno (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridinium dicloride), 0,2 ml de extracto enzimático. Los tubos control se realizaron mediante la adición de 1,2 ml de 100mM de tampón $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ pH 7,5, 0,3 ml de 0,3 M ditionito sódico disuelto en bicarbonato sódico; 0,3 ml de 5mM de dimetil-viológeno (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridinium dicloride). 0,2 ml de extracto enzimático. Los tubos blancos se realizaron mediante la adición de 1,4 ml de 100mM de tampón $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ pH 7,5, 0,3 ml de 0,3M ditionito sódico disuelto en bicarbonato sódico y 0,3 ml de 5 mM dimetil-viológeno (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridinium dicloride). Por último, los tubos estándar se realizaron de la siguiente manera: 1, ml de tampón 100mM $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ pH 7,5, 0,2 ml de 20 mM NO_2Na , 0,3 ml de 0,3 M de ditionito sódico disuelto en bicarbonato sódico, 0,3 ml de 5 mM de dimetil-viológeno (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridinium dicloride).

Una vez preparados todos estos tubos, se incuban a 30°C durante 30 min en oscuridad. Tras la incubación los tubos son agitados vigorosamente de manera que el color azul inicial pasa a transparente. Posteriormente se añadió a cada tubo 20 ml de agua destilada. Para la determinación de la actividad NiR se tomó una alícuota de 0,25 ml a la que se adicionó 1 ml de sulfanilamida al 1% y 1 ml de NNEDA al 0,02 %. Pasados 20 min., se procedió a la lectura de la absorbancia a una longitud de 540 nm.

5.1.2.3. *Ensayo de la actividad GS (EC 6.3.1.2)*

El ensayo se realizó siguiendo el método propuesto por Rees et al. (1995). La extracción para esta enzima se basó en la maceración de 1 g de material vegetal fresco en 6 ml de buffer 100mM Maleico-KOH pH 6,8 que contiene 100mM de sacarosa, β - mercaptoetanol al 2% y etilenglicol al 20%. El homogeneizado resultante se filtró y centrifugó a 15.000 durante 20 min. La mezcla de reacción del ensayo de la actividad GS consistió en: 1 ml de buffer de reacción que consta de: 150 mM de imidazol pH 7,8, 4 mM EDTA- Na_2 , 150 mM de L-glutamato sódico, 45 mM de $\text{MgSO}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 30 mM de hidroxilamina, 10 mM de ATP y 0,5 ml de extracto. Además de los tubos problema se hizo una curva patrón usando distintas alícuotas de una solución madre de 25 μM de γ -glutamil hidroxamato (γ -GH) y un blanco donde se sustituyó el extracto por buffer de maceración. Incubar durante 30 min. a 30°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se paró la reacción añadiendo 1 ml de reactivo de cloruro férrico compuesto de volúmenes iguales de: $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ al 10 % en HCl 2 M, ácido tricloroacético al 24%, HCl al 50%. Posteriormente se centrifugó a 5000 rpm 5 min. y la formación de se γ -GH se determinó a 540 nm frente a una curva patrón de γ -GH.

5.1.2.4. *Ensayo de la actividad GOGAT (EC 1.4.1.14)*

La extracción llevada a cabo para la determinación de la actividad GOGAT fue la misma que la realizada para las actividades de las enzimas NR, NiR.

Para la determinación de la actividad se siguió el método descrito por Singh y Srivastava (1986), la mezcla de reacción consistió en: 1,5 ml de 100mM de tampón $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ pH 7,5, 0,4 ml de 18,75 mM α -cetoglutarato, 0,2 ml de 15 mM de aminoxiacetato, 0,2 ml de 1,5 mM de NADH, 0,15 ml de extracto enzimático. La reacción se inició por adición de 0,4 ml de 75 mM de L-glutamina.

La actividad GOGAT se determinó siguiendo la variación de absorbancia a 340 nm, determinada por la oxidación del NADH utilizando un coeficiente de extinción molar de $6,22 \cdot 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^2$.

5.1.2.5. *Ensayo de la actividad GDH (EC 1.4.1.2)*

El método de extracción para la determinación de la GDH fue la misma que la utilizada para la determinación de las actividades NR, la NiR y la GOGAT. Para la cuantificación de la actividad GDH, se siguió el método propuesto por Singh y Srivastava (1986). Se realizó una mezcla de reacción consistente en 0,75 ml de tampón 100mM de $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ pH 7,5, al que se le adicionó: 0,2 ml de 200mM de sulfato amónico, 0,2 ml de 0,15 de NADH y 0,15 ml de extracto enzimático.

La actividad GDH se determinó siguiendo la variación de absorbancia a 340 nm, determinada por la oxidación del NADH utilizando un coeficiente de extinción molar de $6,22 \cdot 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^2$.

5.1.2.6. *Concentración en NO_3^-*

Para medir la concentración en NO_3^- inicialmente se realizó una extracción consistente en: 0,1 g de material seco, obtenido mediante liofilización, se añadieron 10 ml de agua desionizada. Esta mezcla se agitó en un vuelta-vuelta durante 2 horas. Una vez transcurrido este tiempo, la mezcla resultante fue filtrada y la solución resultante fue filtrada y de la solución resultante se procedió a determinar el NO_3^- , para lo cual se tomó una alícuota de 0,1 ml y se le añadió 0,4 ml de ácido salicílico al 10% diluido en ácido sulfúrico al 96 % (Calado et al., 1975). Posteriormente se le adicionó 9,5 ml de 2 M de NaOH. Los tubos se agitaron y finalmente se procedió a la lectura de la absorbancia a 410 nm frente a una curva patrón de NO_3^- .

5.1.2.7. *Concentración en NH_4^+*

Para la cuantificación de la concentración en NH_4^+ siguió el método de Calado et al. (1975), se tomó 0,1 ml de alícuota de la extracción de la solución resultante de

la extracción descrita para los NO_3^- y se le añadió 1 ml de Reactivo 1 que consiste en: salicilato al 8,5 % y nitroprusiato sódico al 0,06 %. A continuación se le adicionó 1 ml de Reactivo 2 consistente en: hidroxido sódico al 4% y dicloroisocianurato sódico al 0,62 %. Transcurridos 45 min. se procedió a la lectura de la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 630 nm frente a una curva patrón de NH_4^+ .

5.1.2.8. *Concentración en N orgánico*

La cuantificación del N orgánico se llevó a cabo en la solución resultante de una mineralización vía húmeda cuyo procedimiento se detalla a continuación.

Se pesó 0,15 g de material vegetal seco fueron mezclados con 5 ml de ácido sulfúrico puro y la mezcla se dejó reposar durante 48 horas. Transcurrido este tiempo, los tubos se introducen en un baño de arena a una temperatura entre 90-100°C. Esta temperatura se mantuvo en el baño durante aproximadamente 24 horas. Posteriormente, la temperatura del baño de arena se aumentó a 325-350 °C. A esta temperatura se inició la adición de forma regular de entre 0,1 y 0,3 ml de peróxido de hidrógeno libre de P hasta que las muestras vegetales quedaron totalmente transparentes. Finalmente a la mezcla resultante se le añadió 20 ml de agua desionizada y a partir de esta solución se determinó el N orgánico de la misma forma que acabamos de describir para el NH_4^+ (Calado et al., 1975).

5.1.3. **Resultados y Discusión**

Un correcto funcionamiento del metabolismo del N se refleja normalmente en el crecimiento de las plantas como describimos en el capítulo 2, la aplicación de diferentes dosis y formas de Se afecto a la biomasa de la parte aérea de las plantas de lechuga lo que podría deberse al efecto de este elemento traza sobre el metabolismo nitrogenado. Observamos un incremento en biomasa por encima de las plantas control para las dosis de 5 μM de selenito y 5,10 y 20 μM de selenato.

Por otro lado la concentración más elevada añadida de 120 μM para ambas formas produjo los menores valores de biomasa (Fig. 2.1, véase en capítulo 2).

Considerando estos resultados junto con los indicadores de éstos descritos en el capítulo 2 concluimos que la forma Se más fitotóxica es el selenito y que la dosis de 120 μM de Se es la que provocó mayor fitotoxicidad en las plantas de lechuga independientemente de la forma de aplicación.

En cuanto a la asimilación del N, el primer paso tras la absorción del NO_3^- es su reducción hasta NH_4^+ , realizada por las enzimas NR y NiR. La NR es considerada la enzima clave del metabolismo del N estando muy regulada tanto su inducción como su inhibición (Aslam et al., 1990). Distintos estudios otorgan al Se una influencia negativa tanto a nivel de absorción de NO_3^- como sugiere Aslam et al. (1990), como de inhibición de la enzima NR para las dos formas de Se estudiadas (selenito y selenato) (Nowak et al., 2002; Ruiz et al., 2007). En la Figura 5.1.1 y en la Tabla 5.1.1, podemos observar los resultados obtenidos para la concentración de NO_3^- y las actividades NR y NiR en nuestro trabajo. La concentración foliar de NO_3^- muestra una disminución a medida que aumentamos la dosis de Se aplicada, encontrando diferencias significativas entre las distintas dosis y formas, presentándose el menor valor de NO_3^- con la dosis más elevada aplicada de Se (Fig. 5.1.1), observándose la máxima concentración de NO_3^- en las plantas control. Además y según los resultados obtenidos, la concentración de NO_3^- fue superior cuando la forma de Se aplicada fue selenato respecto a la forma selenito (Fig. 5.1.1).

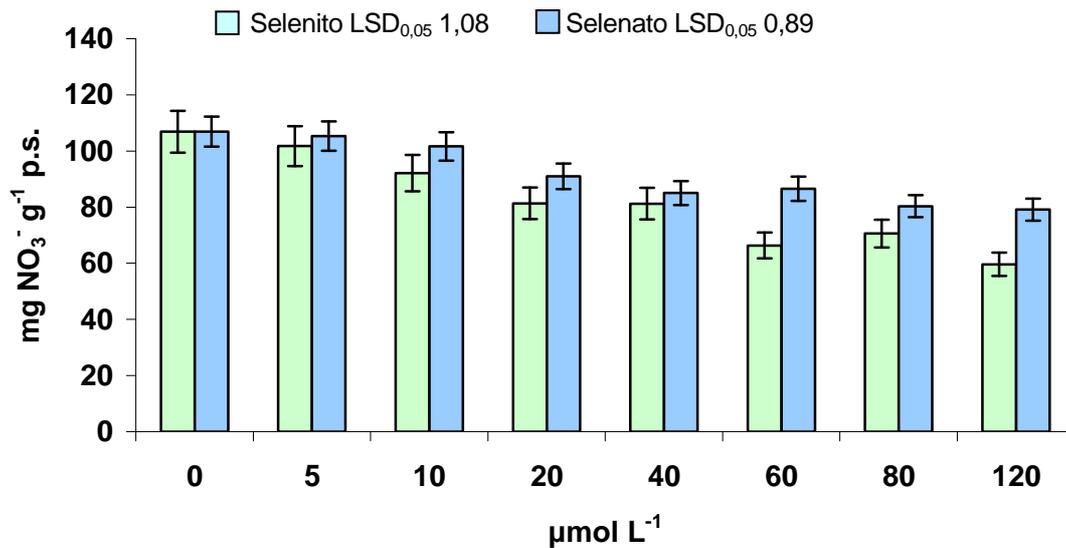


Figura 5.1.1 Concentración de NO₃⁻ en plantas de lechuga sometidas a distintas formas y dosis de Se. Los datos son medias ± error estándar (n=9)

Por otro lado, la actividad de la NR también fue influida por la aplicación de este elemento traza. Así, observamos una inducción de la actividad enzimática cuando el Se fue añadido en cualquiera de las dos formas estudiadas (Tabla 5.1.1), encontrando diferencias significativas entre las distintas dosis y formas aplicadas y produciéndose un incremento en la actividad NR en todas las dosis de selenito aplicadas, observando el máximo valor en la concentración de 20 μM (Tabla 5.1.1). Cuando la forma añadida fue selenato también encontramos un incremento de la actividad NR, siendo la dosis de 10 μM donde se observó la actividad más elevada (Tabla 5.1.1) y 120 μM donde encontramos la mínima actividad NR (Tabla 5.1.1). Por último indicar que la actividad NR fue superior al aplicar selenito respecto a la obtenida cuando se añadió selenato (Tabla 5.1.1).

Tabla 5.1.1 Actividad de la NR y la NiR en plantas de lechuga sometidas bajo distintas formas y dosis de Se. Los datos son medias \pm error estándar (n=9)

Tratamientos	NR		NiR	
	SeO ₃	SeO ₄	SeO ₃	SeO ₄
Dosis (μ M)				
0	0,036	0,036	19,48	19,48
5	0,089	0,096	19,51	19,51
10	0,075	0,104	19,50	19,52
20	0,110	0,078	19,57	19,55
40	0,070	0,054	19,53	19,53
60	0,097	0,067	19,52	19,51
80	0,098	0,051	19,52	19,50
120	0,083	0,042	19,51	19,83
P-valor	***	***	n.s	n.s
LSD	0,01	0,01	0,12	0,63
Análisis de la Varianza				
Formas de Se (F)	***		n.s	
Dosis Se (D)	***		n.s	
FxD	***		n.s	
LSD	0,004		0,15	

Actividad de NR expresada como: $\mu\text{mol NO}_2^-$ formados g^{-1} P.f. min^{-1} .; Actividad de NiR expresada como: $\mu\text{mol NO}_2^-$ transformados g^{-1} P.f. min^{-1} . Los niveles de significación están representados por: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, y n.s, no significativo.

Los resultados obtenidos de la actividad NiR nos mostraron que no existieron diferencias significativas entre las plantas tratadas con Se y no tratadas, observándose valores similares de actividad NiR, para las distintas dosis y formas de Se aplicadas en este estudio (Tabla 5.1.1).

En general podemos indicar que los resultados obtenidos en cuanto la concentración de NO_3^- son similares a los mostrados en un estudio anterior realizado por Aslam et al. (1990), donde la concentración en NO_3^- , se ve influenciada por la forma de Se aplicada sobre plantas de cebada. En dicho estudio el selenito influyó de forma más negativamente que el selenato sobre la acumulación del NO_3^- , lo que nos sugiere que el selenito podría afectar más

rápidamente que el selenato a los transportadores de membrana encargados de la absorción del NO_3^- . Por otro lado la actividad mostrada por la enzima NR respecto a las distintas dosis y formas de Se aplicadas son sorprendentes ya que se produce una inducción de dicha actividad, sólo observada previamente por Nowak et al. (2004). Estos autores observaron un incremento de la NR cuando aplicaron selenio en forma de selenito en plantas de trigo. Por el contrario varios estudios anteriores, muestran una fuerte inhibición de dicha enzima tras la adición de Se, tanto en forma de selenito (Aslam et al., 1990; Nowak et al. 2002) como selenato (Ruiz et al., 2007).

En cuanto a la actividad de la enzima NiR, no se vio afectada por la aplicación de las distintas formas y dosis de Se, ya que no se observaron diferencias significativas en su actividad entre las plantas tratadas con Se y la no tratadas (Tabla 5.1.1). Dichos resultados son similares a los obtenidos por Aslam et al. (1990), quienes tampoco observaron una variación significativa de esta actividad enzimática tras la aplicación del elemento traza. Por el contrario en el estudio realizado por Ruiz et al. (2007) observaron un descenso en la actividad de la NiR, cuando trataban con selenato plantas de girasol, casi 5 veces inferior respecto a las plantas control. Así, los datos obtenidos en nuestro estudio pueden reforzar una vez más el carácter constitutivo que se le ha otorgado a dicha enzima en el metabolismo del N (Barneix, 2007). En definitiva nuestros resultados podrían explicar “a priori” de las siguientes formas:

- (i) En primer lugar la aplicación de Se en ambas formas podrían reducir la absorción de NO_3^- y por tanto la concentración foliar de este nutriente. La disminución en la absorción de NO_3^- en el caso del selenito se podría deber a una degradación de los transportadores de membrana (Aslam et al., 1990), mientras que en el caso del selenato a una interacción antagónica con el NO_3^- .
- (ii) La reducción en la concentración foliar de NO_3^- se podría deber también a la inducción de la actividad NR que se produce tras aplicar ambas formas de Se. El incremento de la actividad NR por el Se podría ser explicado por la inducción que se produce de la asimilación del S tras aplicar el Se. El

aumento de la asimilación de S incrementaría la asimilación de N para mantener la razón 20:1 entre los compuestos orgánicos nitrogenados y los compuestos orgánicos azufrados (Leustek et al., 2000).

Una vez reducido el NO_3^- se forma NH_4^+ que es incorporado a aminoácidos mediante el denominado ciclo GS/GOGAT (Millar y Cramer, 2005). La cantidad de NH_4^+ en las plantas podemos observarla en la Figura 5.1.2. Como podemos comprobar no existieron diferencias significativas en cuanto al contenido en NH_4^+ entre las plantas sometidas a selenito o selenato en cualquiera de sus dosis, y las plantas no tratadas aunque si observamos un aumento en la concentración de NH_4^+ al aumentar las dosis de Se (Fig. 5.1.2).

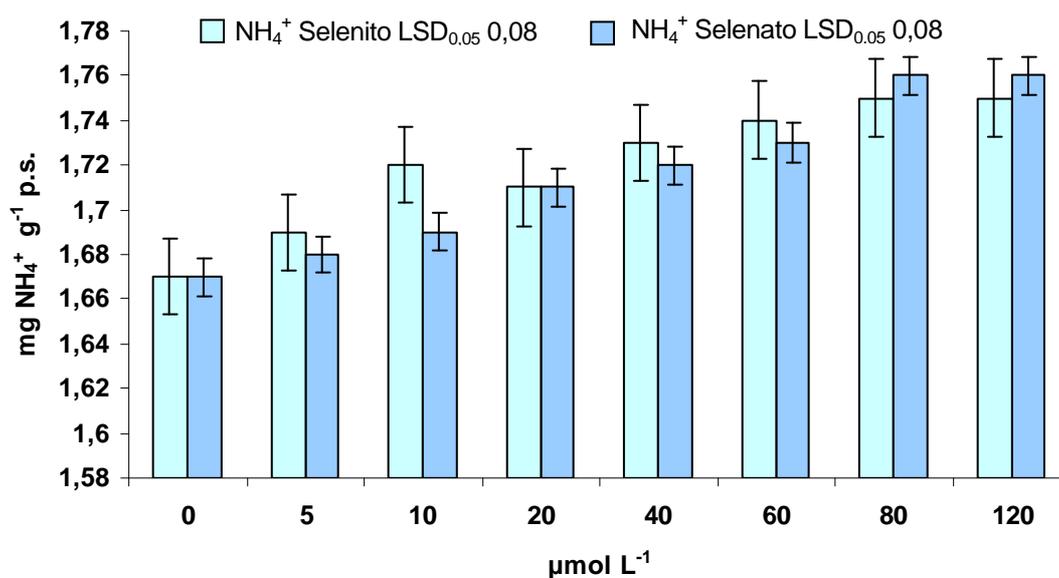


Figura 5.1.2 Concentración en NH_4^+ de las plantas de lechuga bajo diferentes dosis y formas de Se. Los datos son medias \pm error estándar ($n=9$)

En cuanto a la actividad GS ésta incrementó con la aplicación de Se en cualquiera de sus dos formas añadidas (Tabla 5.1.2), existiendo diferencias significativas entre las distintas formas y dosis, pudiéndose observar el máximo valor de la actividad en la concentración de 120 μM ; y siendo la forma de selenito la que produjo un mayor incremento de la actividad GS (Tabla 5.1.2).

Por otro lado, la actividad GOGAT también se vio afectada por la adición del elemento traza (Tabla 5.1.2) encontrándose diferencias significativas entre las distintas dosis y formas de Se añadidas. La aplicación de selenito o selenato produjo un incremento de dicha actividad, observando la máxima, al igual que en el caso de la GS, en la concentración de 120 μM (Tabla 5.1.2). Finalmente la actividad GOGAT también fue superior cuando la forma añadida fue selenito. Los resultados obtenidos nos indican que el Se, indujo la actividad de las enzimas implicadas en la incorporación del NH_4^+ en aminoácidos lo que nos podría explicar porque no encontramos diferencias estadísticas en la concentración de este nutriente entre los distintos tratamientos. Nuestros resultados son contrarios a los observados por Ruiz et al. (2007) quienes obtuvieron en plantas de girasol un fuerte descenso de las actividades de la GS y GOGAT, tras la aplicación de Se en forma de selenato.

Tabla 5.1.2 Actividad enzimática de GS/GOGAT y GDH, de plantas de lechugas sometidas a distintas forma y dosis de Se. Los datos son medias \pm error estándar (n=9)

Tratamientos	GS		GOGAT		GDH	
	SeO ₃	SeO ₄	SeO ₃	SeO ₄	SeO ₃	SeO ₄
Dosis (μM)						
0	1,16	1,16	11,58	11,58	28,57	28,57
5	1,24	1,24	13,71	11,21	38,66	32,21
10	1,41	1,29	12,87	13,04	40,72	32,07
20	1,75	1,44	12,81	11,43	44,31	30,69
40	1,85	1,74	12,89	12,50	37,38	37,05
60	1,46	1,69	13,22	12,36	38,41	40,69
80	1,85	1,51	15,55	13,02	35,46	38,05
120	2,37	1,79	14,97	12,52	42,48	40,89
P-valor	***	***	***	***	***	***
LSD	0,18	0,06	0,63	0,69	0,90	1,06
Análisis de la Varianza						
Formas de Se (F)	**		***		***	
Dosis de Se (D)	***		***		***	
FxD	***		***		***	
LSD	0,09		0,45		0,67	

Actividad de GS expresada como: μ mol de γ -glutamihidroxiato producido g^{-1} p.f. min^{-1} .; Actividad GOGAT expresada como: μ mol NADH oxidado g^{-1} p.f. min^{-1} .; Actividad GDH expresada como: μ mol NADH oxidado g^{-1} p.f. min^{-1} . Los niveles de significación están representados por: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, y n.s, no significativo.

La proteína GDH es la enzima encargada de la desaminación del glutamato produciendo NH_4^+ , aunque también puede jugar un papel importante en la reasimilación del NH_4^+ bajo condiciones de estrés (Kirby et al., 2006). Los valores obtenidos para la actividad de dicha enzima, están representados en la tabla 5.1.2. La aplicación de Se produjo un incremento de la actividad de dicha enzima, existiendo diferencias significativas entre las formas y dosis de Se añadidas. El aumento en su actividad observado, se produjo a medida que la concentración de Se añadida al medio de cultivo fue mayor produciéndose por tanto su máxima actividad en la dosis de 120 μ M (Tabla 5.1.2), y siendo una vez más la forma de selenito la que provocó los valores más elevados (Tabla 5.1.2). Los datos

obtenidos para dicha enzima nos sugieren la posibilidad de una degradación de proteínas no funcionales por la incorporación del elemento traza, y que también la aplicación de Se en cualquiera de sus formas añadidas, aunque especialmente la de selenito, podría generar un aumento de la fotorrespiración (síntoma de estrés), lo que conllevaría un aumento de NH_4^+ que sería de nuevo incorporado a aminoácidos a través de dicha enzima o del ciclo GS/GOGAT. Teniendo en cuenta estas posibles hipótesis estaría justificado que el selenito fuera más fitotóxico que el selenato ya que su aplicación conlleva un mayor aumento de la actividad GDH.

En cuanto a la cantidad de aminoácidos y proteínas totales en las plantas, como pudimos observar en la Tabla 3.3 (*véase en capítulo 3*), ambas formas de Se provocaron un aumento de ambos compuestos a medida que incrementaron las dosis de Se aplicadas, tanto de selenito como de selenato (Tabla 3.3, *véase en capítulo 3*); encontrándose la máxima cantidad en la dosis de 120 μM de Se, y siendo superior el contenido cuando la forma aplicada fue selenito (Tabla 3.2, *véase en capítulo 3*). Estos datos nos sugieren como vimos en el capítulo 3, que el selenito promueve la formación de aminoácidos y su posterior incorporación en las distintas proteínas.

Finalmente, la cantidad de N orgánico,; podemos observarla en la Figura 5.1.3. Los datos reflejan diferencias significativas entre las distintas dosis aplicadas, pero no entre las diferentes formas de Se añadidas (Fig. 5.1.3). En la Figura 5.1.3 observamos que el máximo valor de N orgánico se presentó en la dosis de 60 μM de selenito, y en 80 μM en el caso del selenato, siendo para todos los casos la cantidad asimilada obtenida superior al de las plantas control (no tratadas), lo que nos sugiere que el Se incrementa la asimilación de N, aplicado tanto en forma de selenito como de selenato (Fig. 5.1.3).

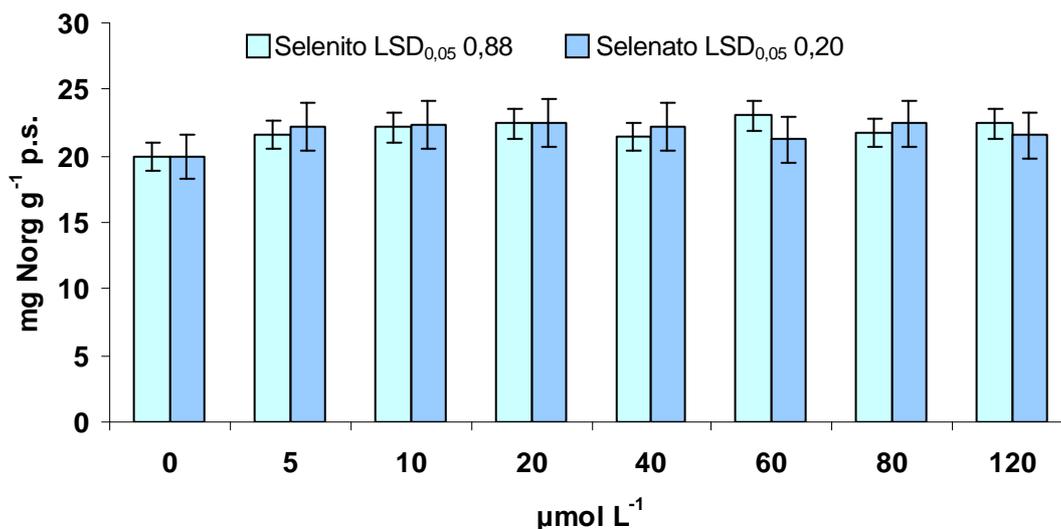


Figura 5.1.3 Concentración de N orgánico en las parte aérea de las plantas de lechugas bajo la influencia de la aplicación de distintas formas y dosis de Se. Los datos son medias \pm error estándar (n=9)

Estos resultados nos confirman que el incremento de la asimilación de N se puede deber al hecho de que la aplicación de Se conlleva un aumento de la asimilación de S (véase en capítulo 3)

5.1.4. Conclusión

En conclusión, podemos indicar que el Se incrementa el metabolismo del N, en cualquiera de sus formas añadidas, siendo la forma de selenito la que provoca una mayor estimulación de las enzimas que forman parte de asimilación del N.

Por otro lado, el selenato también induce la asimilación de N, incrementando dicho metabolismo, pero tras la aplicación de esta forma de Se la biomasa no se vió afectada hasta la concentración de 40 μM , lo que nos indica que la formación de proteínas y aminoácidos producida con dicha forma de selenio provoca un menor estrés que con el selenito.

Finalmente decir, que el selenato es la forma menos tóxica que Se, ya que incremento el metabolismo de dicho elemento sin provocar un aumento del estrés, dando lugar a un aumento en la biomasa de las plantas

En general nuestros resultados se podrían explicar a través de la coordinación existente entre el metabolismo del N y el metabolismo del S. La aplicación de Se, especialmente la de selenito, al inducir la asimilación de S provocaría la inducción del metabolismo del N con el fin de mantener el equilibrio adecuado entre los compuestos orgánicos nitrogenados y azufrados.

5.2. Eficiencia en el uso del N bajo la influencia de distintas dosis y formas de Se

5.2.1. Introducción

La agricultura hasta hace unos años ha estado dominada por la obtención de la máxima productividad, pero actualmente existen otros retos como son: la disminución del impacto medioambiental de las cosechas y los sistemas agrícolas, el aumento en la calidad de los productos obtenidos y la reducción de los costes de producción, englobándose en éste último la eficiencia en el uso del nitrógeno (NUE) por parte de las plantas (Gastal et al., 2002).

La duplicación a nivel mundial de la producción agrícola obtenida durante las cuatro últimas décadas está relacionada con un incremento en siete veces del uso en fertilizantes nitrogenados. Como consecuencia de la utilización de estas cantidades de fertilizantes, en la actualidad la utilización del N y especialmente el NO_3^- uno de los principales factores nocivos medioambientales sobre la diversidad y funcionamiento de los ecosistemas de la tierra (Hirel et al., 2007). Uno de los ejemplos más típicos es su efecto sobre la eutrofización de las aguas dulces y ecosistemas marinos como resultado del lixiviado de N cuando se le añaden grandes dosis de fertilizantes a las cosechas (Tilman et al., 1999). Por otro lado, también existe una emisión de gases nitrogenados como son los óxidos de N que pueden reaccionar con la capa de ozono y el amoníaco en forma de gas el cual es tóxico para la salud humana (Stulen et al., 1998).

Las plantas cultivadas solo son capaces de convertir entre un 30-40% del N aplicado en productos comestibles, como el grano en el caso de las gramíneas (Raun y Johnson, 1999). Así, Moll et al. (1982) ya definieron NUE como producción de biomasa por unidad de N disponible en el suelo. El NUE puede ser dividido en dos procesos fundamentales. Por otro lado, la eficiencia en la absorción de N es la habilidad de la planta de extraer el N del suelo, el cual normalmente está en forma de NO_3^- o NH_4^+ (Lea y Azevedo, 2006). Esta característica depende de la disponibilidad del elemento, de los distintos genotipos

de las plantas cultivadas (Hirel y Lemarie, 2005) y de la eficiencia en la utilización del N absorbido, la cual se define como la capacidad de las plantas en transferir este elemento a los distintos órganos vegetales, principalmente en forma de proteínas (Lea y Azevedo, 2006). En este sentido, existe en la actualidad un gran interés en la identificación de los procesos involucrados en la regulación de la absorción de N y su metabolismo dentro de los vegetales (Andrews et al., 2004), además de una mejora en el incremento del NUE (Mayes et al., 2005). Uno de los principales objetivos de la mejora del NUE en los vegetales es la reducción de los niveles foliares de NO_3^- .

Dado el incremento en el uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos en la agricultura intensiva llevada a cabo en las últimas décadas los vegetales cultivados suelen contener altas concentraciones de NO_3^- (Santamaría, 2006). La presencia de elevadas cantidades de este compuesto en los vegetales supone un problema importante para la salud humana. A pesar de que el NO_3^- "per se" no es relativamente tóxico, aproximadamente un 5% del ingerido es convertido en la saliva y en el tracto gastrointestinal en NO_2^- (Pannala et al., 2003). La formación de NO_2^- y compuestos nitrosos, los cuales son formados a través de la unión del NO_2^- con otras sustancias antes y después de la ingestión, pueden producir serias patologías en humanos ya que son tóxicos (Speijers et al., 1996). Uno de los efectos más conocidos del NO_2^- es su habilidad para reaccionar con la hemoglobina, proteína encargada del transporte del O_2 a través del organismo, formando la metahemoglobina cuya principal consecuencia es menguar la distribución de O_2 en el cuerpo (Knobeloch et al., 2000). Otra de las consecuencias del NO_2^- es la formación de nitrosaminas, compuesto que es un potente cancerígeno en humanos (Mendiga et al., 2003). Por estas razones es importante evitar el consumo durante largo tiempo y la producción de vegetales con altas concentraciones de NO_3^- .

En este sentido, el Comité Científico sobre la alimentación de la Comisión Europea (SCF) ha fijado la ingesta diaria recomendada de este compuesto en un máximo de 3,7 mg de NO_3^- por Kg de peso corporal limitando el contenido de NO_3^-

espectacularmente en los vegetales dado que estos constituyen una de las principales fuentes de NO_3^- en la dieta. Los principales vegetales con un alto contenido en NO_3^- suelen ser las patatas, lechuga y espinacas. Debido al carácter hiperacumulador de NO_3^- de las lechugas y también de las espinacas, la Comisión Europea con el fin de proteger la salud pública y en respuesta a lo recomendado por la SCF, legislo el contenido máximo que pueden tener estos vegetales para asegurar un consumo saludable de dichos vegetales. En relación a la lechuga existen diferentes niveles de NO_3^- permitidos según la variedad del vegetal cultivado, así en nuestro caso y para el tipo de lechuga estudiada en este trabajo, la concentración máxima permitida por la Comisión Europea es de 4500 mg Kg^{-1} p.f.

En la actualidad, además de llevarse a cabo una gran investigación sobre la mejora del NUE en plantas, también se están desarrollando de forma importantedistintos programas de biofortificación con elementos traza entre los cules se encuentra el Se dada la importancia que tiene este elemento sobre la salud humana. Sin embargo, existen muy pocos trabajos que estudien el impacto de estos programas de biofortificación sobre el NUE de los cultivos. En definitiva y considerando que tanto la concentración de NO_3^- y su utilización son factores determinantes en este tipo de cultivo, el propósito de este capítulo fue determinar si el NUE fue afectado por la aplicación de diferentes formas y dosis de Se.

5.2.2. Material y Métodos

Los apartados correspondientes a material vegetal y condiciones de crecimiento, muestreo vegetal y análisis estadístico fueron similares a los descritos en el capítulo 2 (*véase en material y métodos, capítulo 2 (2.2)*).

Cálculo de los distintos parámetros del NUE

5.2.2.1. Concentración total de N (TNC)

Se calculó sumando la concentración total de N orgánico y la concentración de NO_3^- (Sorgona et al., 2006). El resultado fue expresado en mg N g^{-1} p.s.

5.2.2.2. Acumulación total de N (TNA)

Fue calculado usando el TNC y el peso seco total de las hojas, mediante la fórmula: $\text{TNA} = \text{TNC} \times \text{peso seco foliar}$ (Sorgona et al., 2006). El resultado fue expresado en mg de N.

5.2.2.3. Razón de la eficiencia del N (NER)

Se calculó siguiendo la fórmula descrita por Sorgona et al. (2006): $\text{NER} = \text{Biomasa foliar} / \text{TNA}$. Los resultados son expresados como g p.s. mg^{-1} N.

5.2.2.4. Eficiencia en la utilización del N (NUtE)

Se calculó mediante la siguiente ecuación: $\text{NUtE} = \text{TNA} / \text{peso seco de la raíz}$. Siendo expresada como mg N g^{-1} p.s. Usando el peso seco de la raíz (Elliot y Läuchli, 1985).

5.2.2.5. Eficiencia en la absorción de N (NUpE)

Fue calculada mediante la siguiente fórmula en la cual se utilizó el peso seco total de las hojas y el TNC (Siddiqui y Glass, 1981). $\text{NUpE} = \text{Peso seco total de las hojas} / \text{TNC}$. El resultado fue expresado como $\text{g}^2 \text{ p.s. mg}^{-1}$ N.

5.2.3. Resultados y Discusión

La producción en las lechugas viene dada por el crecimiento en biomasa de la parte aérea de las mismas ya que es la zona comestible del vegetal. Como pudimos comprobar, el Se afectó al crecimiento de las planta (Fig. 2.1, véase en capítulo 2), obteniendo un mayor incremento cuando se aplicó selenato respecto al selenito.

Aunque existen varios factores que afectan al crecimiento, desarrollo y calidad de la lechuga, el N es un elemento determinante para la producción de este cultivo. Por tanto, la determinación de la concentración de NO_3^- , N orgánico, y el N total son frecuentemente analizados con el fin de decidir la necesidad de la aplicación de fertilizantes nitrogenados (Lawlor 2002).

Así, el NO_3^- es un elemento esencial para el crecimiento de las plantas, ya que participa en la síntesis de proteínas para la formación de material vegetal y en el mantenimiento del potencial osmótico vegetal (Seginer, 2003). Como hemos podido comprobar en el apartado anterior, la aplicación de Se en cualquiera de sus formas provocó una disminución en la concentración foliar de NO_3^- respecto a la concentración de las plantas no tratadas con dicho elemento (Fig. 5.1.1, véase en el capítulo 5, apartado 5.1). Por el contrario la concentración de N orgánico se vio incrementado con la aplicación de selenito y selenato (Fig. 5.1. 3, véase en el capítulo 5, apartado 5.1).

Finalmente y en cuanto al TNC se observo una disminución a medida que se incrementaron los dosis de Se añadidas (Fig. 5.2.1), encontrando diferencias significativas ($P < 0,001$) tanto entre las distintas dosis como entre las diferentes formas aplicadas de Se. Como podemos comprobar fue la forma de selenato donde encontramos una mayor cantidad de N total con respecto a la forma en selenito (Fig. 5.2.1). Además, observamos el mínimo contenido de este nutriente en las dosis más elevadas de Se, es decir, cuando se aplicó una concentración de $120 \mu\text{M}$ de Se (Fig 5.2.1). Estos resultados nos pueden indicar que el aporte de Se disminuye la absorción del N, ya que un aumento de la dosis añadida produjo una

disminución del N total. Lo que nos indica un efecto beneficioso del aporte de Se incrementando la calidad nutricional de las plantas ya que produjo un descenso en la concentración de NO_3^- .

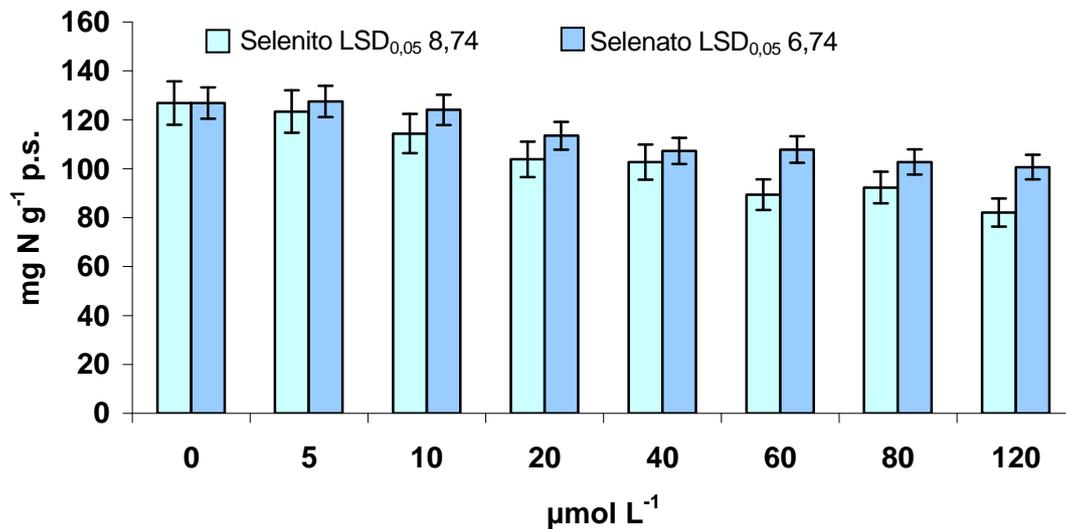


Figura 5.2.1 TNC de las plantas de lechuga sometidas a distintas formas y dosis de Se. Los datos son medias \pm error estándar (n=9)

La eficiencia en el uso del N viene dada fundamentalmente por los parámetros TNA, NER, NUtE y NUpE (Sorgona et al., 2006).

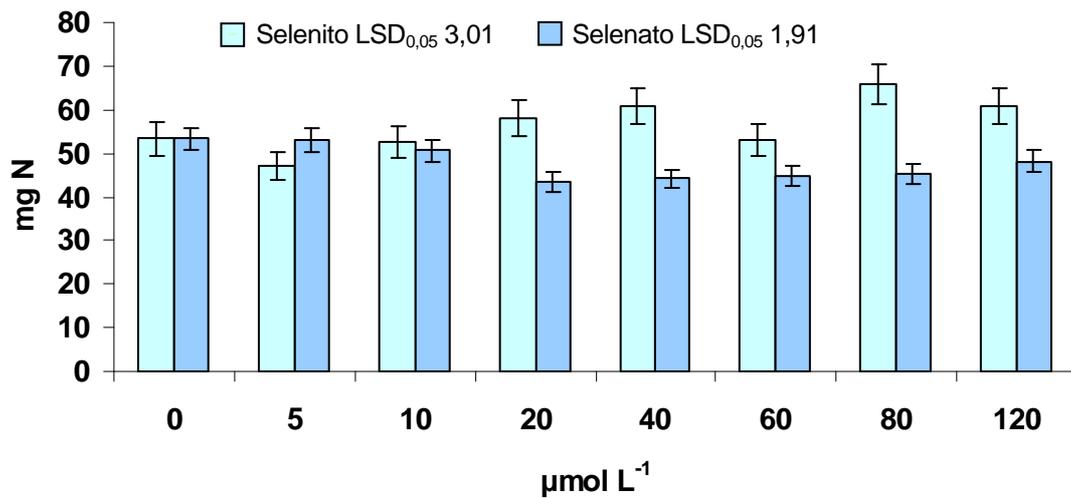


Figura 5.2.2 TNA de lechugas sometidas a diferentes formas y dosis de Se. Los datos son medias \pm error estándar (n=9)

Los resultados obtenidos para el TNA nos muestran un incremento del mismo ($P < 0,001$) cuando aplicamos Se en forma de selenito a medida que incrementamos la concentración añadida (Fig. 5.2.2). Sin embargo cuando la forma aplicada fue selenato los valores observados para este parámetro disminuyeron con un aumento de las dosis aplicada (Fig. 5.2.2) ($P < 0,001$), presentándose mínimo valor en la dosis de 40 μM .

En la Figura 5.2.3, podemos observar los datos obtenidos para el NER y NUtE. En cuanto a NER, encontramos que cuando aplicamos selenito los valores disminuyen cuando la concentración aplicada supera la dosis de 5 μM ($P < 0,01$), y obteniéndose el mínimo valor NER en la concentración de 120 μM de selenito (Fig. 5.2.3). Sin embargo, cuando la forma aplicada fue selenato observamos un aumento del NER a partir de la dosis de 20 μM siendo en esta dosis donde encontramos el máximo valor ($P < 0,01$). En cuanto a los datos del NUtE encontramos un comportamiento similar al descrito para el NER, siendo el selenato a partir de la dosis de 20 μM el que incremento el NUtE respecto a las plantas control, mientras que el selenito disminuye este valor respecto a las plantas control a dosis superiores de 5 μM (Fig. 5.2.3). Estos resultados son coincidentes con los datos obtenidos respecto a la biomasa (Fig. 2.1, véase en

capítulo 2), donde el selenato produjo un incremento en dicho parámetro superior al selenito.

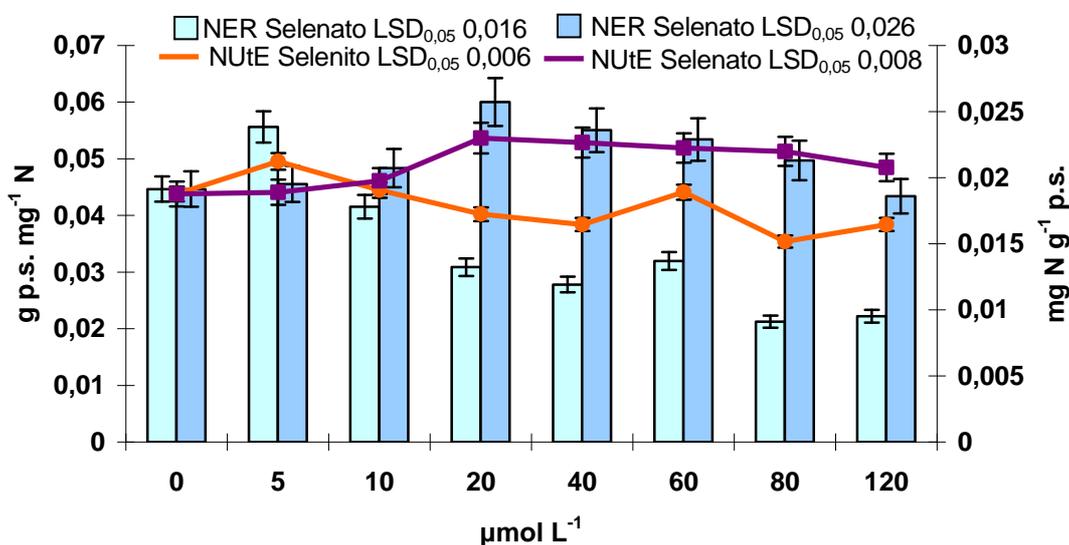


Figura 5.2.3 NER y NUtE en plantas de lechuga bajo distintas formas y dosis de Se. Los datos son medias ± error estándar (n=9)

Finalmente, los resultados obtenidos para el NU_pE, los podemos observar en la Fig. 5.2.4. Los valores encontrados nos muestran diferencias significativas (P<0,001) entre las distintas dosis aplicadas, observando una disminución con respecto al de las plantas control, y además siendo los datos superiores en el caso de la aplicación de selenito (Fig 5.2.4). Estos resultados en definitiva nos confirman que el Se reduce la absorción de NO₃⁻, incrementando por consiguiente la calidad de los productos agrícolas.

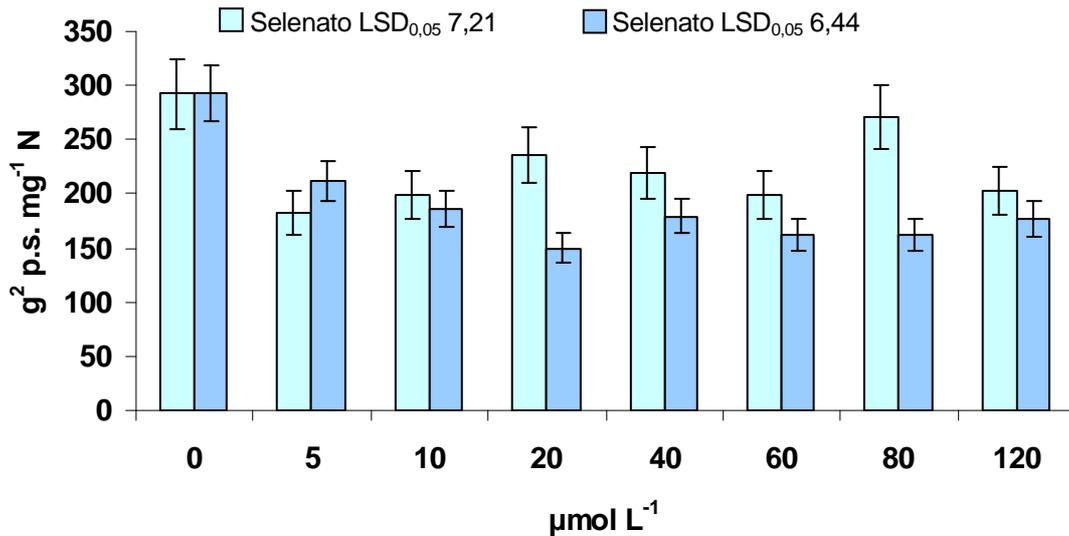


Figura 5.2.3 NUpE en plantas de lechuga sometidas a distintas dosis de selenato y selenito. Los datos son medias \pm error estándar (n=9)

5.2.4. Conclusión

En conclusión podemos indicar según los distintos parámetros observados en este apartado, junto a los valores de biomasa foliar obtenidos en las plantas, la aplicación de Se afectó al NUE de la lechuga. Tanto la aplicación de selenito como de selenato redujo la absorción de NO_3^- disminuyéndose por tanto la NUpE. Sin embargo la aplicación de selenato, especialmente la dosis de 20 μM supuso una inducción de la utilización de N reflejado por un aumento de NER y NUtE lo que coincidió con un aumento de la producción de biomasa.

En definitiva y según estos resultados la aplicación de 20 μM de selenato sería muy beneficioso para el cultivo de lechuga ya que además de reducir los niveles foliares de NO_3^- supondría una mejora significativa del NUE. Y por tanto de la producción agronómica del cultivo.

Capítulo 6
***Efecto del Se (selenito vs
selenato) sobre el estado
nutricional en las plantas de
lechuga***

6.1. Introducción

Desde hace 150 años, los científicos han estudiado la nutrición vegetal con el fin de conocer los procesos de absorción, acumulación, transporte y funcionalidad de los distintos elementos químicos necesarios para el crecimiento de las plantas. De estos estudios se ha obtenido mucha información sobre el crecimiento y la composición de las plantas en respuesta a los distintos medios de cultivos, los programas de fertilización a emplear en las distintas zonas agrícolas, así como las distintas concentraciones de dichos elementos en las soluciones nutritivas para las diferentes plantas.

Un nutriente vegetal se define como un elemento químico necesario para el crecimiento y reproducción de las distintas especies vegetales. El término elemento esencial es comúnmente usado para la identificación de los nutrientes vegetales. Por consiguiente, para que un elemento sea un nutriente debe cumplir ciertos criterios. El principal criterio, es que el elemento sea requerido por la planta para poder completar su ciclo de vida. En segundo lugar, que dicho elemento no puede ser sustituido por otro y en tercer lugar, que todas las plantas lo requieran para su desarrollo (Barrer y Pibeam, 2006).

El primero de los criterios enunciados, fue el primero con el cual se estableció la esencialidad de los distintos nutrientes, e incluye la propiedad de que el elemento tiene un efecto directo sobre el crecimiento y desarrollo de la planta (Arnon y Stout, 1939). El segundo de los criterios establece que el papel de los elementos es único en la fisiología o metabolismo de las plantas, de manera que ningún otro elemento es capaz de sustituirlo en todas sus funciones. Por ejemplo, el manganeso (Mn) puede sustituir al magnesio (Mg), en algunas de sus funciones pero no en todas (Marschner, 1995). El tercero se refiere a que la esencialidad es universal entre todas plantas.

Actualmente se consideran 17 elementos esenciales para las plantas. El carbono (C), el oxígeno (O₂) y el hidrógeno (H₂) son tomados principalmente del agua y el aire. Los 14 restantes (N₂, fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), Mg, S, hierro (Fe), Mn, cobre (Cu), boro (B), molibdeno (Mo), cloro (Cl) y níquel

(Ni), son obtenidos del suelo o la solución nutritiva. Dichos nutrientes son clasificados según los requerimientos de las plantas, es decir, los elementos que son requeridos en cantidades considerables son los macronutrientes, son acumulados desde 0,1 % en adelante de peso seco de la planta. Los elementos requeridos en pequeñas cantidades por las plantas son los micronutrientes, y generalmente son acumulados en cantidades menores del 0,01 % del peso seco de la planta (Parker y Pilbeam, 2006).

A continuación pasaremos a describir muy brevemente las principales funciones fisiológicas de los nutrientes que hacen que su estudio resulte esencial para mantener un crecimiento adecuado para cualquier planta.

Comenzaremos con los macronutrientes. Así, el P, es un elemento esencial para las plantas, cuya funciones fisiológicas son formar parte de componentes esenciales como: fosfoproteínas, tales como nucleoproteínas (del núcleo) o fosfolipidoproteínas (en membranas). Además de nucleótidos libres como ATP o NADP. El N, cuyo metabolismo ha sido estudiado en el capítulo 5 (véase *capítulo 5.1*), es un macronutriente con importantes funciones como es ser constituyente de compuestos esenciales en el vegetal tanto para su estructura (proteínas) como para su metabolismo (ácidos nucleicos, NAD, NADP, FAD, clorofilas, citocromos, etc.). El K, es otro de los macronutrientes vegetales, a pesar de no entrar en la composición de ninguna molécula ni estructura celular, es fundamental para el crecimiento vegetal por, entre otras funciones: interviene en la apertura y cierre de estomas, además de influir en el equilibrio hormonal, su falta hace que se pierda la dominancia apical, es regulador del pH celular y finalmente es activador de unos 50 sistemas enzimáticos (ATPasas, oxidorreductasas, transferasas, sintetetasas, quinasas, aldolasas, etc.).

En el capítulo 3, estudiamos metabolismo del S, macronutriente importante en el desarrollo vegetal por sus funciones fisiológicas entre las que encontramos que forma parte de aminoácidos azufrados (metionina, cisteína, cistina, etc), de coenzimas (el CoA-SH, tiamina, glutatión, etc), de los grupos -SH que son clave en multitud de reacciones enzimáticas determinando según su forma, oxidada o reducida, la actividad de las mismas y en los últimos años se ha

indica que también forman parte de las fitoquelatinas, unas proteínas de bajo peso molecular pero con un elevado número de aminoácidos azufrados (cisteína principalmente), han cobrado un gran interés por formar complejos con metales pesados (Cd, Cu, Pb, etc.) constituyéndose en uno de los principales mecanismos de defensa de las plantas frente a estos agentes tóxicos en su mayoría. El Ca en las plantas funciona como activador de enzimas como proteíno-quinasas como ATPasas y NAD kinasa, sólo o unido a la calmodulina (proteína que regula el contenido de Ca celular). Es constituyente de la laminilla media de la pared celular (pectato cálcico) además es un componente de membranas (sal cálcica del ácido fosfatídico), y por último actúa como segundo mensajero, implicado en la fosforilación de algunas proteínas, de manera que el Ca puede desempeñar un importante papel en la actividad y regulación de algunos enzimas. Su unión reversible a una pequeña proteína citosólica, la calmodulina, le permite ejercer una importante función como modulador enzimático y desempeñar un papel fundamental en las señales hormonales. Finalmente, y terminando con los elementos clasificados como macronutrientes, describiremos funciones del Mg en las plantas, este elemento tiene un papel esencial en la FS, ya que forma parte de la molécula de clorofila. Asimismo es activador enzimático, como cofactor de casi todos los enzimas que actúan sobre sustratos fosforilados (como ATP), por lo que es de gran importancia en el metabolismo energético y está presente en procesos claves como la unión y estabilización de las subunidades del ribosoma y, por tanto, en la síntesis de proteínas, e incluso, en la transcripción del mensaje genético por la activación de la RNA polimerasa.

Seguidamente describiremos las funciones de los distintos micronutrientes vegetales. El Fe forma parte de los grupos catalíticos de muchos enzimas redox del tipo hemoproteínas, como citocromos, peroxidasas, catalasas, etc., que presentan un grupo Fe-porfirina como núcleo prostético del grupo hemo. Se encuentra unido a grupos tiónicos de la cisteína en otras proteínas S-Fe, como las sulfoferro proteínas que son clave en la fotosíntesis, siendo el caso de la ferredoxina, la nitrito reductasa y la sulfito reductasa. Además estas proteínas son también fundamentales en la fijación de N (nitrogenasa) y en la respiración. El Mn es muy importante por su papel transportador de electrones

en el lado donador del FSII. Además se encuentra formando parte de la Mn-SOD (Mn superóxido dismutasa), una de las isoenzimas de la SOD presente en las mitocondrias y los peroxisomas y, de forma más irregular, en los cloroplastos, también es activador del enzima NAD-ME en plantas C4 y de algunas enzimas del ciclo de Krebs (descarboxilasas y deshidrogenasas). Igualmente es esencial para la síntesis de clorofila ya que regula la actividad del sistema enzimático encargado de la formación del ácido δ -aminolevulínico (ALA), precursor de las profirinas, y el paso de protoporfirina-Mg a protoclorofilida. El Cu es otro de los micronutrientes cuya funciones son intervenir en el transporte de electrones, formando parte de la plastocianina en la FS y de la citocromo C oxidasa en la RP y ser un constituyente de las enzimas fenolasas y de la superóxido dismutasa. El Zn es fundamental en la biosíntesis de auxinas (necesario para la síntesis de triptófano, precursor del AIA), también es un activador de al menos 80 sistemas enzimáticos como anhidrasa carbónica y algunas deshidrogenasas. Destacando entre sus funciones su participación en la estabilidad de los ribosomas y su presencia en la RNA polimerasa, lo que le convierte en regulador de la expresión génica. Finalmente, describiremos las funciones del B y el Cl, entre las que encontramos en el caso del B que tiene un papel básicamente estructural estando relacionado con los principales procesos de la fisiología vegetal como son la división y elongación celular, la germinación y regulación hormonal. Además estimula la elongación del tubo polínico y actualmente existen datos de que la relación B/Ca desempeña un importante papel no solo a nivel estructural, sino también a nivel de transducción de señales. Con respecto al Cl, su función más conocida está relacionada con el lado donador de electrones del FSII, interviniendo en la fotólisis del agua, pero conjuntamente tiene importancia como soluto osmóticamente activo, estando implicado en el mecanismo de apertura/cierre de estomas junto con el K⁺.

Como hemos comentado con anterioridad a lo largo de este trabajo, el Se no es considerado un elemento esencial en las planta, aunque si se le reconoce como elemento beneficioso sobre las mismas. La similitud química del Se y S, no solo hace que sea absorbido por los mismo transportadores sino que también es asimilado por la planta por la misma vía que el S, obteniendo como

productos finales de su asimilación, selenocisteína y seleniometionina, que posteriormente puede ser incorporado dentro de proteínas.

Dado el desarrollo como hemos indicado a lo largo de esta Tesis Doctoral que están adquiriendo los programas de biofortificación con Se es imprescindible estudiar las relaciones existentes entre este elemento traza y los distintos nutrientes esenciales con el fin de realizar con éxito este tipo de programas de biofortificación sobre dichos cultivos. Sin embargo y a pesar de esta importancia los trabajos al respecto son muy escasos. Los trabajos mas abundantes se refieren principalmente a la relación entre el Se y el S existiendo entre ambos una relación antagónica como describimos en el capítulo 3. Otros estudios más concisos son por ejemplo el de Wun y Huang (1992). Estos autores estudian la relación en algunos nutrientes como son el Ca, el K, el Mg, el P, el Cu, el Fe, el Mn y el Zn cuando aplicaron una concentración de Se y varias de S, en tréboles, concluyendo que la concentración de Ca incrementaba pero el P disminuía con la aplicación de Se. Además observaron un incremento en la concentración de Cu, Mn y Zn pero solo cuando se inhibía fuertemente el crecimiento de la planta. Posteriormente Hooper y Parker (1999), indicaron que un incremento en fosfato disminuía la absorción de Se en forma de selenito. Conclusión esta que fue corroborada en 2004 por Liu et al. en plantas de arroz.

Por tanto, debido a la falta de información sobre las relaciones del Se (selenato vs selenito) con el resto de nutrientes, y la importancia de un buen estado nutricional de la planta para su óptimo crecimiento, la finalidad de este capítulo, fue estudiar el efecto de la aplicación del Se en distintas dosis y formas, sobre el estado nutricional en plantas de lechugas.

6.2. Material y métodos

Los apartados correspondientes a material vegetal y condiciones de crecimiento, muestreo vegetal y análisis estadístico fueron similares a los descritos en el capítulo 2 (*véase en material y métodos, capítulo 2 (2.2)*). Del

material liofilizado se midió el contenido en macronutrientes totales (Ca, Mg, P, K, N y S) y micronutrientes totales (Fe, Mn, Cu, Zn, B y Cl).

6.2.1. Determinación de los nutrientes minerales.

Para la extracción de N, P, K, Na, Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, B y Cu se procedió a una mineralización por "vía húmeda" de las muestras vegetales, siguiendo el procedimiento propuesto por Wolf (1982). Para ello se pesó entre 0,15 g de hojas de lechuga liofilizadas, los cuales fueron sometidos al proceso de mineralización con H₂SO₄ 12 N y H₂O₂ al 30% libre de P, y a una temperatura que varió entre los 275 y los 300°C. A partir del mineralizado resultante, y tras la adición de 20 ml de H₂O desionizada, se llevó a cabo la determinación de los nutrientes minerales anteriormente citados.

La determinación del N orgánico se realizó por colorimetría (*véase en el capítulo 5.1*).

Para la determinación del P se usó el método colorimétrico del nitrovanadomolibdico (Hogue et al., 1970). A 0,1 ml del mineralizado se le añadieron 3,9 ml de H₂O desionizada y 6 ml del reactivo de fósforo (agua desionizada, molibdato-amónico, vanadato-amónico y ácido nítrico). Las muestras se agitaron y se esperó 60 min. Pasado ese tiempo se procedió a su lectura a una longitud de onda de 430 nm, frente a una curva patrón de K₂HPO₄ que estaba en iguales condiciones que las muestras problema.

Los nutrientes K y Na se analizaron mediante fometría de llama (Lachica et al., 1973), mientras que el Mg y Ca fueron cuantificados por espectrofotometría de absorción atómica (Hocking y Pate, 1977). Para ello, en un tubo de ensayo se puso 0,1 ml del mineralizado y se le añadió 10 ml de H₂O desionizada que contenía óxido de lantano. El Mg y Ca total fueron cuantificados directamente en la dilución anterior por espectrofotometría de absorción atómica (Hocking y Pate, 1977), en espectrofotómetro Perkin-Elmer mod. 5100, con sistema de inyección Perkin-Elmer Fias-100, automuestreador Perkin-Elmer AS-90, con lámparas de cátodo hueco de los distintos elementos y con llama aire-

acetileno. El K y Na se midieron directamente en la disolución anterior por fotometría de llama (Lachica et al., 1973). Las lecturas obtenidas se interpolaron frente a sus curvas patrón correspondientes leídas bajo las mismas condiciones.

Los micronutrientes Cu, Fe, Mn y Zn en su forma total, fueron determinados por espectrofotometría de absorción atómica (Hocking y Pate, 1977).

El B total se determinó por el método colorimétrico de azometina-H (Wolf, 1974). Para ello, se tomó 1 ml del mineralizado, al que se le añadieron 2 ml de solución enmascarante, se agitó y a continuación se añadió azometina-H 0.9 %, preparada en el momento de la determinación y que lleva un 2 % de ácido ascórbico. Se vuelve agitar y se deja reposar 2 horas a 20 °C para desarrollo de color. Pasado este tiempo y tras agitación se determina en absorbancia a 410 nm frente a curva patrón de B.

La extracción del S orgánico se realizó mediante una mineralización por vía nítrico/perclórico como fue descrita en el capítulo 3 (*véase material y métodos, capítulo 3*). Para ello, una cantidad de 0.2 g de tomate cherry molido y seco fue sometida a una digestión con una mezcla de HNO₃/HClO₄ (v/v) y H₂O₂ al 30%. La determinación de S orgánico se efectuó sobre una alícuota del mineralizado utilizando BaSO₄ en suspensión por medio de un agente tensoactivo como es la goma arábica, todo ello frente a una curva patrón de K₂SO₄ y realizando la lectura turbidimétrica a 435 nm (Novozamsky y Vaneck, 1977).

La determinación de Cl, NO₃⁻ y SO₄²⁻ se llevó a cabo a partir de una extracción acuosa, según el método propuesto por Cataldo et al. (1975) con ligeras modificaciones. Para la determinación de Cl, 0,1 g de hoja de lechuga liofilizada y junto a 10 ml de H₂O desionizada se sometieron a agitación vuelta-vuelta durante 120 min., seguidamente se filtraron con Whatman nº 4. El contenido de Cl realizó siguiendo el método de Diatloff y Rengel (2001), basado en el desplazamiento del biocianato por el ión cloruro, que en presencia de Fe³⁺ forma el complejo tiocianato férrico altamente coloreado. Para ello se realizó una mezcla de reacción que contenía 0,25 ml de extracto, 2 ml de 50

mM de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ y finalmente 0,25 ml de una solución saturada de tiocianato de mercurio II [$\text{Hg}(\text{SCN})_2$] al 75%. Las muestras se agitaron vigorosamente y después de 15 min se procedió a su lectura a una longitud de onda de 460 nm frente a una curva patrón de KCl de 0,1 a 10 mM.

La determinación de NO_3^- se basa en una reacción colorimétrica formada por la unión de los con el ácido salicílico en un medio básico como fue descrita en el capítulo 5.

Para la determinación de SO_4^{2-} seguimos el método propuesto por Novozamsky y Vaneck (1977). Para ello, se realizó una mezcla de reacción que contenía 1 ml de extracto, 4 ml de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ al 8% y 1 ml de goma de acacia al 25 %. Posteriormente, se procedió a la lectura de la transmitancia a 430 nm frente a una curva patrón de K_2SO_4 . El S total corresponde a la suma de las concentraciones de S orgánico y SO_4^{2-} .

6.3. Resultados y Discusión

El estado nutricional es muy importante para el correcto funcionamiento metabólico de las células vegetales, y por consiguiente para un crecimiento y desarrollo óptimo de las plantas. Por lo tanto el éxito de un programa de biofortificación de Se tendrá como requisito mantener o mejorar el estado nutricional de la planta para no alterar la producción del cultivo.

Los fertilizantes por lo general más utilizados en la agricultura son los que contienen N, P y K, dada la importancia que tienen estos tres elementos en el desarrollo de las plantas. La concentración de N esta representado en la Tabla 6.1, y como observamos, se muestra que la aplicación de Se en cualquiera de sus formas hizo decrecer el contenido en N en las plantas tratadas respecto a las control (Tabla 6.1), obteniéndose los valores mínimos en la dosis de 120 μM , y siendo los valores siempre superiores cuando se añadió selenato. En cuanto a la concentración de P los datos obtenidos nos muestran que el Se reduce la

concentración de este elemento a partir de la dosis de 10 μM para ambas formas de selenio con respecto al de las plantas control, observando el valor más bajo en la concentración de 120 μM siendo la forma en selenito quién redujo más la concentración. Los datos obtenidos coinciden con a los obtenidos por Wu y Huang (1992), quiénes encontraron un incremento del P en plantas de trébol cuando se aplicaron dosis bajas de selenato. En definitiva nuestros datos muestran una relación antagónica entre la aplicación de Se y la concentración de P, al igual que indican los trabajos de Hooper y Parker (1999) y Liu et al. (2004).

Tabla 6.1 Concentración en N, P y K en plantas de lechuga bajo la influencia de Se aplicado de diferentes formas y dosis. Los datos son medias \pm error estándar (n=9).

Tratamientos	N		P		K	
	SeO ₃	SeO ₄	SeO ₃	SeO ₄	SeO ₃	SeO ₄
Se (μM)						
0	126,84	126,84	10,22	10,26	41,22	41,22
5	123,39	127,51	10,58	12,25	41,96	42,15
10	114,37	124,07	10,48	10,97	40,73	41,2
20	103,82	113,49	9,3	9,7	40,11	44,9
40	102,7	107,25	8,4	10,1	41,40	39,2
60	89,37	107,84	8,53	9,7	40,73	43,6
80	92,27	102,77	7,81	9,25	39	40,7
120	82,05	100,66	8,1	8,8	39	43,5
P-valor	***	***	***	***	n.s.	n.s.
LSD	8,74	6,74	0,60	0,86	3,22	8,45
Análisis de la Varianza						
Formas de Se (F)	***		***		n.s.	
Dosis de Se (D)	***		***		n.s.	
FxD	***		*		n.s.	
LSD	1,71		0,51		6,25	

Concentración de N expresado como: $\text{mg N g}^{-1}\text{p.s.}$, concentración de P expresado como: $\text{mg P g}^{-1}\text{p.s.}$, concentración de K expresado: como $\text{mg K g}^{-1}\text{p.s.}$ Los niveles de significación están representados por: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, y n.s, no significativo.

Finalmente, la concentración foliar de K total no sufrió variaciones entre las plantas tratadas y no tratadas (Tabla 6.1), no mostrándose diferencias significativas entre las distintas formas de Se aplicadas ni entre las diferentes concentraciones. Estos datos coinciden con los de Wu y Huang (1999) quienes tampoco observaron diferencias respecto a este nutriente cuando aplicaron Se en forma de selenato. Los datos, nos sugieren que el Se y el K no presentan ningún tipo de relación en nuestro estudio.

En la Tabla 6.2, se muestran los resultados obtenidos, para los macronutrientes Ca, Mg y S, tras la aplicación de diferentes dosis y formas de dicho elemento. Observamos una disminución en la concentración de Ca cuando se aplicó Se a la solución nutritiva respecto al encontrado en las plantas control (Tabla 6.2), siendo mayor la reducción de este elemento cuando la forma añadida fue selenato (Tabla 6.2). Igualmente los datos mostraron una disminución en el contenido de Mg, encontrándose diferencias significativas tanto entre las dosis como entre las formas de Se añadidas, observando concentración mínima en la dosis aplicada de 120 μM de selenito y 60 μM de selenato (Tabla 6.2). Sin embargo, y al contrario de lo que observábamos con la concentración de Ca, la forma de Se que indujo un menor contenido en Mg fue el selenito (Tabla 6.2). Estos resultados son diferentes a los encontrados por Wu y Huang (1992) quienes no observaron variación en el contenido de ambos nutrientes en plantas de trébol cuando se le aplicó Se a bajas dosis en forma de selenato, lo que nos sugiere que a bajas concentraciones el Se no repercute en la absorción de estos elementos.

Tabla 6.2 Concentración en Ca, Mg y S en plantas de lechuga sometidas a distintas dosis y formas de Se. Los datos son medias \pm error estándar (n=9).

Tratamientos	Ca		Mg		S	
	SeO ₃	SeO ₄	SeO ₃	SeO ₄	SeO ₃	SeO ₄
Se (μ M)						
0	31,60	31,60	3,28	3,28	1,60	1,60
5	31,08	29,43	3,65	2,84	1,73	1,83
10	28,76	25,82	2,6	3	1,35	1,74
20	28,69	27,58	1,37	2,03	1,48	1,89
40	31,37	28,61	1,21	2,8	1,72	3,87
60	32,6	24,5	1,78	1,15	1,55	2,96
80	33,65	28,06	1,34	2,5	1,84	3,21
120	30,81	28,15	1,03	1,25	1,50	2,51
P-valor	**	***	***	***	n.s	***
LSD	2,19	1,27	0,46	0,56	0,60	0,03
Análisis de la Varianza						
Formas de Se (F)	***		***		***	
Dosis de Se (D)	***		***		***	
FxD	***		***		***	
LSD	1,23		0,32		0,04	

Concentración de Ca expresado como: mg Ca g⁻¹p.s., concentración de Mg expresado como: mg Mg g⁻¹p.s., concentración de S expresado: como mg S g⁻¹p.s. Los niveles de significación están representados por: * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, y n.s, no significativo.

Por otro lado la concentración en S total, no sufrió variación significativa cuando la forma aplicada de Se fue selenito con respecto a la de las plantas no tratadas (Tabla 6.2). Sin embargo cuando añadimos selenato encontramos diferencias significativas entre las dosis, observando un incremento en el contenido de S por encima del de las plantas control para todas las concentraciones aplicadas (Tabla 6.2), siendo en la dosis de 40 μ M donde se observó el valor más elevado, produciéndose un descenso a partir de esta concentración. Los resultados obtenidos concuerdan con Hopper y Parker (1999) quienes indicaron que el selenito no afectaba a la absorción de S. No obstante, son contrarios a estos autores ya que ellos indicaron que el selenato disminuía el contenido en S, no correspondiéndose estos datos con los obtenidos en nuestros resultados, y

pudiendo observar un comportamiento sinérgico de ambos elementos a nuestras concentraciones.

A continuación, en las Tablas 6.3 y 6.4, mostraremos como influyó el Se sobre en contenido en micronutrientes. Así, en cuanto la concentración en Fe (Tabla 6.3) nuestros datos indicaron un incremento en la concentración de este elemento a medida que aumentamos las dosis de Se aplicadas, tanto para el selenito como el selenato, obteniéndose la máxima concentración en la dosis de 80 μM de selenito y 20 μM de selenato. Estos resultados son contrarios a los obtenidos por Wu y Huang (1992), quienes observaron un descenso en el contenido de Fe cuando se aplicó Se.

Asimismo en la Tabla 6.3, podemos observar los datos obtenidos para la concentración en Mn encontrando diferencias significativas entre las dosis de Se aplicadas. Los valores nos indican que el selenito disminuye los valores de Mn con respecto a los observados en las plantas control (Tabla 6.3). Sin embargo cuando la forma de Se añadida fue selenato, los datos nos muestran que dicha forma, tiende a incrementar el contenido en este elemento (Tabla 6.3), lo que nos sugiere que la forma de Se presente en el medio influye de forma diferente sobre la concentración foliar de Mn total.

Tabla 6.3 Concentración en Fe, Mn, Cu y Zn en plantas de lechuga sometidas a distintas formas y dosis de Se. Los datos son medias \pm error estándar (n=9).

Tratamientos	Fe		Mn		Cu		Zn	
	SeO ₃	SeO ₄	SeO ₃	SeO ₄	SeO ₃	SeO ₄	SeO ₃	SeO ₄
Se (μ M)								
0	171	171	196	196	7	7	22	22
5	175	139	165	182	5	6	25	22
10	152	227	155	227	5	5	20	21
20	205	274	187	212	10	7	25	19
40	220	184	207	209	17	6	24	22
60	183	213	193	213	18	5	22	23
80	267	171	181	204	13	5,8	20	17
120	223	225	155	182	10	4,6	19	18
P-valor	***	***	***	***	***	*	n.s.	n.s
LSD	92	82,3	12,7	0,86	1,53	1.8	8,72	6,7
Análisis de la Varianza								
Formas de Se (F)	***		***		*			n.s
Dosis de Se (D)	***		***		*			n.s
FxD	***		*		*			n.s
LSD		1,71		0,51		4,25		13,27

Concentración en Fe expresado como: μ g Fe g⁻¹p.s., concentración en Mn expresado como: μ g Mn g⁻¹p.s., concentración de Cu expresado: como μ g Cu g⁻¹p.s., concentración de Zn expresado: como μ g Zn g⁻¹p.s. Los niveles de significación están representados por: * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, y n.s, no significativo.

Por otro lado, la influencia de Se en sus dos formas respecto a la concentración de Cu fue contraria a la observada con el Mn. Como podemos comprobar el selenito incremento el contenido de este elemento respecto al de las plantas no tratadas, encontrándose el valor más elevado en la dosis de 60 μ M. Sin embargo el selenato disminuyo el contenido en Cu respecto al de las plantas control, observándose el mínimo valor en la dosis de 120 μ M. Los datos obtenidos para el selenato son distintos a los obtenidos por Wu y Huang (1992), quienes no encontraron variación en la concentración de este micronutriente cuando aplicaron Se en forma de selenato. En definitiva nuestros datos nos sugieren que el selenito

y el selenato tienen efectos contrarios sobre la absorción y acumulación del Cu en las plantas.

Tabla 6.4 Influencia de diferentes formas y dosis de Se sobre la concentración de Cl y B. Los datos son medias \pm error estándar (n=9).

Tratamientos	Cl		B	
	SeO ₃	SeO ₄	SeO ₃	SeO ₄
Se (μ M)				
0	14	14	73	73
5	12	14	63	68
10	15	12	56	59
20	13	15	54	54
40	11	15	50	53
60	13	11	52	50
80	13	14	50	48
120	14	13	48	42
P-valor	n.s	n.s	***	***
LSD	4,6		18	21,7
Análisis de la Varianza				
Formas de Se (F)	n.s		n.s	
Dosis de Se (D)	n.s		n.s	
FxD	n.s		n.s	
LSD	1,2		16,9	

Concentración de Cl expresado como: mg Cl g⁻¹p.s., concentración de B expresado como: μ g B g⁻¹p.s. Los niveles de significación están representados por: * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001, y n.s, no significativo.

Finalmente, en la Tabla 6.3 podemos observar la concentración foliar de Zn total. Los datos nos muestran que ni el selenito ni el selenato produjeron diferencias significativas entre las distintas dosis aplicadas y las plantas control. Los resultados obtenidos nos indican que el Se no influye sobre la absorción de este micronutriente.

Por último, en la Tabla 6.4 se representan los resultados obtenidos para el Cl y el B. Respecto al Cl nuestros datos no mostraron diferencias significativas ni entre las dosis ni entre las formas de Se aplicadas. En cuanto al B, los resultados obtenidos indican que se produjo un descenso en la concentración de este elemento en las plantas tratadas (Tabla 6.4), encontrándose la menor concentración en este elemento en la dosis de 120 μM para ambas formas de Se.

6.4. Conclusión

En conclusión y según nuestros resultados podemos indicar que el Se aplicado en la solución nutritiva tiene afectó al estado nutricional de la planta, dependiendo este efecto en gran medida de la forma de Se aplicada al medio de cultivo.

Así, la aplicación de selenito afecta de forma más importante el estado nutricional de la planta, ya que el aporte de dicha forma produjo un descenso en la concentración de elementos tales como N, P, Mg, S, Zn y B a medida que se aumentaba la dosis aplicada, lo que provocaría un desequilibrio nutricional y por tanto una alteración en el crecimiento y desarrollo de la planta como se puede comprobar al observar los datos de biomasa para estos tratamientos.

Sin embargo, si la forma de Se aplicada a la solución nutritiva es selenato, sólo se produce una interacción negativa más importante a la del selenito con los nutrientes Ca y Cu. Además, el selenato muestra un efecto sinérgico con el S hasta la concentración de 40 μM , lo que podría conllevar a un mejor crecimiento de las plantas.

Finalmente, indicar que para desarrollar un programa de biofortificación con Se, y según los datos obtenidos, la forma más recomendada de aplicación sería el selenato, ya que ésta alteró de forma menos importante el estado nutricional de las plantas lo que permitiría un mejor crecimiento de las plantas respecto a la aplicación de selenito.

Conclusiones

1. La aplicación de Se más beneficiosa para la realización de un programan de biofortificación con dicho elemento es la forma en selenato, ya que produce una mayor producción e incremento de Se en la hoja de lechuga más específicamente la dosis de 40 μM de selenato sería la más adecuada de utilizar en un cultivo hidropónico ya que dicha concentración las hojas contendrían el Se suficiente para satisfacer las necesidades fisiológicas humanas sin producir una pérdida en la producción agrícola.
2. El Se aplicado en cualquiera de sus dos formas selenito o selenato en el medio de cultivo incrementa el contenido en compuestos antioxidantes de las plantas, siendo la forma selenato quien produce un mayor incremento de estos compuestos y por lo tanto de la calidad nutricional del cultivo de lechuga.
3. La forma y el rango de aplicación del Se al medio de cultivo afecta a la asimilación del S por parte de la planta, y fundamentalmente a sus productos finales, repercutiendo en el crecimiento de la misma. Así, cuando la forma añadida es selenito se produce una mayor asimilación de S incrementándose la posibilidad de generación de Se-cisteína lo que explicaría porque esta forma de Se es más fitotóxica. Por otro lado, cuando la forma aplicada es selenato, los productos finales del metabolismo se desvían hacia la formación de compuestos organosulfurados como el glutatión lo que podría reducir el efecto tóxico del Se bajo esa forma.
4. El efecto del Se sobre la formación y detoxificación de H_2O_2 depende de la forma de aplicación del elemento al medio de cultivo. Mientras el selenito provoca una disminución de la actividad de las enzimas encargadas de la detoxificación de H_2O_2 , el selenato induce la respuesta antioxidante, pudiéndose considerar a bajas dosis un tratamiento

inductor de este sistema que mejoraría las respuestas de resistencia de las plantas frente a un estrés.

5. El Se incrementa el metabolismo del N en cualquiera de sus formas añadidas, siendo la forma selenito la que provoca una mayor estimulación de las enzimas que intervienen la vía de asimilación del N. La mayor asimilación del S tras la aplicación de Se podría explicar el incremento en la asimilación de N puesto que las plantas mantienen un equilibrio entre compuestos orgánicos nitrogenados y compuestos orgánicos azufrados. Además la aplicación de Se afecto al NUE de la lechuga, siendo la forma de selenato la que redujo de forma más importante la concentración foliar de NO_3^- y provocó un mejor uso del N, lo que se reflejó en un incremento de la biomasa superior en todas las dosis de selenato respecto al selenito.

6. El Se aplicado en la solución nutritiva afecta el estado nutricional de las planta dependiendo en gran medida de la forma de Se aplicada. Así, sí la forma aplicada es selenito el estado nutricional de la planta se ve más afectado, ya que dicha forma produce un descenso en el contenido de elementos tales como Mg, S, N, P, Mn, Zn y B, alterándose el desarrollo de la planta. Por el contrario la aplicación de selenato sólo produce una interacción negativa con los elementos Ca y Cu y además muestra un efecto sinérgico con el S hasta la concentración de 40 μM de selenato.

Bibliografía

- Anderson JW (1993) Selenium interactions in sulfur metabolism. *In* LJ De Kok, ed, Sulfur Nutrition and Assimilation in Higher Plants: Regulatory, Agricultural and Environmental Aspects. SPB Academic Publishing, The Hague, The Netherlands. 49-60
- Arthur J.R. (2003). Selenium supplementation: does soil supplement help and why?. *Proceeding of Nutrition Society*. **62** 393-397
- Asada K. (1994). Production and action of active oxygen species in photosynthetic system. *En: Foyer C.H.; Mullineaux P.M. (eds). Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Sustersms in Plnats. CRC Press, Boca Raton, Florida, 77-103*
- Asada K. y Takahashi M. (1987). Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. *En: Kyle D.J; Osmond C.B.; Arntzen C.J. (eds.) Photoinhibition. Elsevier, Amsterdam 227-287*
- Barak P, Goldman IL (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
- Baszczyk A, Brodzik R, Sirko A (1999) Increased resistance to oxidative stress in transgenic tobacco plants overexpressing bacterial serine acetyltransferase. *Plant Journal* **20** 237-243
- Bekaert S.; Storozhenko S.; Mehrshali P.; Bennett M.J.; Lambert W.; Gregory III J.F.; Schubert K.; Hugenholtz J.; Van der Straeten D. Hanson A.D. (2007). Folate biofortification in food plants. *Trends in Plant Science*. **13** 27-35
- Benzie I.E.F. y Strain J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Annals of Biochemistry*. **239** 70-76
- Blasco B.; Rios J.J.; Cervilla L.M.; Sánchez-Rodríguez E.; Ruiz J.M.; Romero L. (2008). Iodine biofortification and antioxidant capacity of lettuce: potential benefits for cultivation and human health. *Annals of Applied Biology*. **152** (3) 289-299

- Bouis H.E. (1996). Enrichment of food staples through plant breeding: a new strategy for fighting micronutrient malnutrition. *Nutrition Reviews*. **54** 131-137
- Broome C.S.; McArdles F.; Kyk J.A.M.; Andrews F.; Hart C.A.; Arthur J.R.; Jackson M.J. (2002). Functional effects of Se Supplementation in healthy UK adults. *Free Radical Biological and Medical*. **33 Suppl 1** S261
- Bukhov N.G. y Mohanty P. (1999). Elevated temperature stress effect on photosystems: characterization and evaluation of the nature of heat induced impairments. En: Singhal G.S.; Renger G.; Sopory S.R.; Irrgang K-D.; Govingjee (eds.). *Photosynthesis and photomorphogenesis*. Nasora Publishing House 617-648
- Cadenas E.(1989). Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual Review of Biochemistry*. **58** 79-110
- Campos-Bowers M.H. y Wittenmyer B.F. (2007). Biofortification un China: policy and practice. *Health Research Policy and System*. **5** 10-17
- Cartes P.; Gianfreda L.; Mora L.M. (2005). Uptake of Selenium and its antioxidant activity in ryegrass when applied as selenate and selenite form. *Plant and Soil*. **256** 359-367.
- Caulfield L.E. y Back R.E. (2004). Zinc deficiency. En. Ezzati M.; Lopez A.D.; Rodgers A.; Murray C.J.L. (eds.). *Comparative quantification of health risks: Global and regions burden of diseases attribution to selected major risk factors*. **Vol I**
- Chapin III F.S. (1980). The mineral nutrition of wild plants. *Annual Reviews Ecology System* **11** 223
- Chen L., Yang F., Xu J., Yun, H, Hu Q, Zhang Y., Pan G (2002) Determination of Selenium Concentration of Rice in China and effect of fertilization of Selenite and Selenate on Se content of Rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **50** 5128-5130
- Clark L.C.; Combs Jr. G.F.; Trunbull B.W.; Slate E.H.; Slate D.K.C.; Chow J.; Davis L.S.; Glover R.A.; Graham G.F.; Gross E.G.; Krongrad A.; Leshner Jr. J.L.; Park H.k.; Sander Jr. B.B.; Smith C.L.; Taylor J.R. (1996). Effect of Se supplementation for cancer prevention in patient with carcinoma of the skin. *JAMA*. **276** 1957-1963

- Combs Jr. G.F.; Clark L.C.; Trunbull B.W. (1997). Reduction of cancer risk with oral supplement of selenium. *Biomedical Environmental Science*. **10** 227-234
- Connor A.M.; Stephens M.J.; Hall H.K.; Alspach P.A. (2005). Variation and heritabilities of antioxidant activity and total phenolic content estimated from a red raspberry factorial experimental. *Journal of American Society for Horticulture Science*. **130 (3)** 403-411
- Creissen G.P.; Edwards A.; Mullineaux P.M. (1994). Gluthatione reductase and ascorbate peroxidase. En: Foyer C.H.; Mulleneaux P.M. (eds.) *Causes of photooxidative stress and ameloration of defece system in plants*. CRC Press, Boca Raton, FL 343-364
- Del Río L.A.; Sevilla F.; Sandalio L.M.; Palma J.M. (1991). Nutritional effect and expression of SODs: induction and gene expression, diagnostics, prospective protection against oxygen toxicity. *Free Rad Res Commun*. **12-13** 819-827
- Demming-Adams B y Adams W.W. (1996). The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends Plant Sci*. **1** 21-26
- Díaz de la Garza R.; Gregory III J.F.; Hanson A.D. (2007). Folate biofortification of tomato fruit. *The National Academy of Sciences of the USA*. **4 (10)** 4218-4222
disponible: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/HG72/hg72-2002.pdf>
- Diwadkar-Navsariwala V, Prins GS, Swanson SM, Birch LA, Ray VH, Hedayat S, Lantvit DL, Diamond AM (2006) Selenoprotein deficiency accelerate prostate carcinogenesis in a transgenic model. *Proccedings of the National Academy of Sciences of USA*. **103** 8179-8184
- Droux M (2004) Sulfur assimilation and the role of sulphur in plant metabolism: A survey. *Photosynthesis Research*. **79** 331-348
- Egert M. y Tevini M. (2002). Influence of drought on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress in leaves of chives (*Allium schoenoprasum*). *Environmental of Experimental Botany*. **48** 43-49

- Elstner E.F. (1987). Metabolism of activated oxygen species. En: Davies D.D. (eds.) The biochemistry of plants. Vol II, Biochemistry of metabolism. Academic Press, San Diego, CA, 252-315
- Fee J.A.; Valentine J.S. (1997). Chemical and physical properties of superoxide. En: Michelson A.M; McCord J.M; Fridovitch I. (eds.) Superoxide and Superoxide dismutases. Academic Press, New York 19-60
- Ferrari G, Renosto F (1972) Regulation of sulfate uptake by excised barley roots in the presence of selenate. *Plant Physiology*. **49** 114-116
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (2006). Disponible: <http://faostat.fao.org/site/554/DesktopDefault.aspx?PageID=554>
- Foyer C.H.; Lelandais M.; Kunert K.J. (1994). Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum*. **92** 696-717
- Fu J. y 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
- Gálvez M.; Martín-Cordero C.; Houghton P.J.; Ayuso M.J. (2005). Antioxidant activity of methanol extract obtained from *Plantago* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53** 1927-1933
- Gebhardt S.E. y Tomas R.G. (2002). Nutritive value of foods. USA Department of Agricultura.
- Gossett D.R.; Millhollon E.P.; Lucas M.C. (1994). Antioxidant responses to NaCl stress in salt-sensitive cultivars of cotton. *Crop Science*. **34** 706-714
- Graham R.D.; Senadhira D.; Beebe S.; Iglesias C.; Ortiz-Monasterio I. (1999). Breeding for micronutrient density in edible portions of staple food crops: conventional approaches. *Fields Crops Research*. **60** 57-80
- Gutteridge J.M.C. y Halliwell B. (1990). The measured and mechanism of lipid peroxidation in biological system. *Trends Biochemistry Science*. **15** 129-138

- Halliwell B. y Gutteridge J.M.C. (1989). Free radicals in biology and medicine. Second Edition. Oxford: Clarendon Press.
- Hambridge K.M. (2000). Human zinc deficiency. *Journal of Nutrition*. **130** S1344-S1349
- Harms K, von Ballmoos P, Brunold C, Höfgen R, Hesse H (2000) Expression of a bacterial serine acetyltransferase in transgenic potato plants leads to increased levels of cysteine and glutathione. *Plant Journal*. **22** 335-343
- Hartikainen H.; Xue T.; Piironen V. (2000). Selenium as an antioxidant and pro-oxidant in ryegrass. *Plant and Soil*. **225** 193-200
- Hass J.D.; Beard J.L.; Murray-Kolb L.E.; del Mundo A.M.; Felix A.; Gregorio G.B. (2005). Iron-biofortified rice improves the Iron store of nonanemic Filipino women. *The Journal of Nutrition*. **135** 2823-2830
- Havaux M. y Tardy F. (1997). Thermostability and photostability of photosystem-II in leaves of the Chlorina-F2 barley mutant deficient in light-harvesting chlorophyll A/B protein complexes. *Plant Physiology*. **113** 913-923
- Hawkesford MJ; Zhao F.J. (2007). Strategies for increasing the selenium content of wheat. *Journal of Cereal Science*. **46** 282-292
- Heinonen I.M.; Lethonen P.J.; Hopia A.I. (1998). Antioxidant activity of berry and fruit wine and liquors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **46** 25-31
- Höfgen R, Kreft O, Willmitzer L, Hesse H (2001) Manipulation of thiol contents in plants. *Amino Acids*. **20** 291-299
- Hopper JL, Parker DR (1999) Plant availability of selenite and selenate as influenced by the competing ions phosphate and sulfate. *Plant and Soil*. **210** 199-207
- 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

- Hu Q.; Chen L.; Xu J.; Zhang Y.; Pan G., (2002). Determination of Selenium concentration in rice and effect of foliar application of Se-enriched fertilizer or Sodium selenite on the Selenium content of rice. *Journal of the Sciences of Food and Agriculture*. **82** 869-872
- Hulshof P.J.M.; Kosmeijer-Schuil T.; West C.E.; Hollman P.C.H. Quick screening of maize for provitamin A content. *Journal of Food Composition and Analysis*. **20** 655-661
- Ingestad T. y Agren G.I. (1995). Plant nutrition and growth: basic principles. *Plant and Soil*. **168-169** 15-20
- Ip C, Ganther HE (1992) Comparison of Se and S analogs in cancer prevention. *Carcinogenesis* 13:1167-1170
- Ip C, Hayes C, Budnick RM, Ganther HE (1991) Chemical form of Se, critical metabolites, and cancer prevention. *Cancer Research*. **21** 595-600
- Ip C, Lisk DJ (1995) Efficacy of cancer prevention by high-selenium garlic is primarily dependent on the action of selenium. *Carcinogenesis*. **16** 2649-2652
- Ip C, Lisk DJ, Stoewsand GS (1992) Mammary cancer prevention by regular garlic and selenium-enriched garlic. *Nutrition and Cancer* 17: 279-286.
- Ip C, Lisk DJ, Thompson H (1996) Selenium-enriched garlic inhibits the early stage but not the late stage of mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis* 17: 1979-1982.
- Ip C. y Ganther H.E. (1992). Comparison of Se and S analogs in cancer prevention. *Carcinogenesis*. **13** 1167-1170
- Ip C.; Hayes C.; Budnick R.M.; Ganther H.E. (1991). Chemical form of Se, critical metabolites, and cancer prevention. *Cancer. Research*. **21** 595-600
- Johns T y Eyzaguirre P.B. (2007). Biofortification, biodiversity and diet: A search for complementary application against poverty and malnutrition. *Food Policy*. **32** 1-24
- Kim D.; Jeong S.W.; Lee C.Y. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*. **81** 321-326.

- King J.C. (2002). Evaluating the impact of plant fortification on human nutrition. *The Journal of Nutrition*. **132 (3) S511- S513**
- Klessing D.F. y Malamy J. (1994). The salicylic acid signal in plants. *Plant Molecular Biology*. **26** 1439
- Kopsell DA, Randle WM (1997) Selenate concentration affects selenium and sulfur uptake and accumulation by "Granex" onions. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. **122** 721-726
- Kramer P.J. y Boyer J.S. (1995). *Water relation of plants and soils*. San Diego Academic Press
- Lappartient AG, Touraine B (1996) Demand-driven control of root ATP sulfurylase activity and SO_4^{2-} uptake in intact canola. *Plant Physiology*. **111** 147-157
- Lappartient AG, Vidmar JJ, Leustek T, Glass ADM, Touraine B (1999) Inter-organ signalling in plant: regulation of ATP sulfurilase and sulfate transporter genes expression in roots mediated by phloem-translocated compounds. *Planta Journal* **18** 89-95
- Larcher W. (1987). *Streei planzen*. *Naturwissenschaften*. **74** 158-167
- Läuchi A (1993) Selenium in plants: uptake, function, and environmental toxicity. *Botica Acta* **106** 455-468
- Lee G. P. y Park K. W. (1998). Effect of Selenium concentration in the Nutrient solution on the Growth and internal quality of Endive. *Journal Korea Society Horticulture Science*. **39 (4)** 391-396
- 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 Korea Society Horticulture Science*. **42 (5)** 483-486
- Leja M.; Mareczek A.; Ben J. (2003). Antioxidant propieties of two cultivars during long-term storage. *Food Chemistry*. **80** 303-307

- Leustek T, Saito K (1999) Sulfate transport and assimilation in plants. *Plant Physiology*. **120** 637-643
- Levander OA (1982) Se: Biochemical actions, interactions, and some human health implication. In: A.S. Prasad (ed.). *Clinical, biochemical, and nutritional aspect of trace element*. Alan R Liss, New York pp 345-368
- Levitt J. (1980). Responses of plants to environmental stresses. Vol 1. Cilling, freezing, and light temperature stresses. Academic Press, London
- Lingan K.; Mao W.; Dongling B. (2005). Selenium modulates the activities of antioxidant enzymes, osmotic homeostasis and promotes the grown of sorrel seedling under salt stress. *Plant Growth Regulation*. **45** 155-163
- Loewen P.C.; Switala J.; Vonossowski I.; Hillar A.; Christie A.; Tattrie B.; Nocholls P. (1993). Catalase Hpii of *Escherichia coli* catalyzes the conversion of protoheme to Cis-heme-D. *Biochemistry*. **38** 10159-10164
- Logan HM, Cathala N, Grignon C, Davidian JC (1996) Cloning of a cDNA encoded by member of the Arabidopsis thaliana ATP sulphurylase multigene family: expression studies in yeast and in relation to plant sulfur nutrition. *Journal of Biological Chemistry*. **271** 12227-12233
- Lyons G, Ortiz-Monasterio I, Stangoulis J, Graham R (2005) Selenium concentration in wheat grain. Is there sufficient genotypic variation to use in breeding?. *Plant and Soil*. **269** 369-380
- 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 Harvest Plust programs. *Nutrition Reviews*. **62** 247-252
- Magg D.D. y Glen M.W. (1967). Toxicity of Selenium: farm animals. En. Muth O.H.; Oldfield J.E.; Heswings P.H. (eds). *Selenium in Biomedicine* Conn. AVI, Westport, pp 127-140
- Matthäus B. (2002). Antioxidant activity of extract obtained from residues of different oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **50** 3444-3452

- Mayer J.E.; Pfeiffer W.H.; Beyer P. (2008). Biofortified crops to alleviate micronutrient malnutrition. *Current Opinion in Plant Biology*. **11** 166-170
- Mayland H.F.; James L.F.; Sonderegger J.L.; Panter K.E. (1989). En. Selenium in agriculture and the environment. Jacobs L.W. (ed.). Soil Science Society of America. 15
- Mehdy M.C.; Lambais M.R. (1997). Spatial-distribution of chitinase and beta-1,3-glucanase transcripts in bean arbuscular mycorrhizal root under low and high soil phosphate condition. *New Phytology*. **140** 33-42
- 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 -817.
- Mikkelsen RL , Wan HF (1990) The effect of selenium on sulfur by barley and rice. *Plant and Soil* . **121**151-153.
- Minguez-Mosquera M.I.; Jaren-Galen M.; Garrido-Fernandez J. (1993). Lipoxygenase activity during pepper ripening and processing of paprika. *Phytochemistry*. **32** 1103-1108
- Mittler R. y Zilinskas B.A. (1991). Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of a cDNA encoding pea cytosolic ascorbate peroxidase. *FEBS Letter*. **289** 257-259
- Moran J.F.; Becana M.; Iturbe-Ormaetxe I.; Frechillas S.; Klucas R.V.; Aparicio-Tejo P. (1994). Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta*. **194** 346-352
- Murphy T.M. (1997). Resistance of plants to the effects of ultraviolet radiation. En: Basra A.S.; Basra R.K. (eds). *Mechanisms of environmental stress resistance in plants*. Harwood Academic Publishers 151-190.
- Nagarathna K.C.; Shetty S.A; Shetty H.S. (1993). Phenylalanine ammonia-lyase activity in pearl millet seedling and its relation to downy mildew disease resistance. *Journal of Experimental Botany*. **44** 1291-296

- Nakamura K, Hayama A, Masada M, Fukushima K, Tamura G (1987) Measurement of Serine Acetyltransferase activity in crude plant extract by a couple assay system using cysteine synthase. *Plant of Cell Physiology*. **28** 885-891
- Nestel P.; Bouis H.E.; Meenakshi J.V.; Pfeiffer W. (2006). Biofortification of staple food crops. **136** 1064-1067
- Nikiforova V, Kempa S, Zeh M, Maimann S, Kreft O, Casazza AP, Riedel K, Tauberger E, Höfgen R, Hesse H (2002) Engineering of cysteine and methionine biosynthesis in potato. *Amino Acids* **22** 259-278
- Noctor G, Gomez L, Vanacker H, Foyer CH (2002) Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *Journal of Experimental Botany*. **53** 1283-1304
- Nriagu J.O. (1991). Heavy methals in the environmental. CEP Consultants, Edinburgh. **Vol 1** 1-5
- Oikeh S.O.; Menkir A.; Maziya-Dixon B.; Welch R.; Glahn P. (2003). Assesment of concentration of Iron and Zinc and bioavailable Iron in grain of early-maturing tropical maize varieties. **51** 3688-3694
- Orser CS, Salt DE, Pickering IJ, Prince R, Epstein A, Ensley BD (1999) Brassica plants to provide enhanced human mineral nutrition: selenium phytoenrichment and metabolic transformation. *Journal of Medical Food*. **1** 253-261
- Ortiz-Monasterio J.I.; Palacios-Rojas N.; Meng E.; Pixley K.; Trethowan R.; Peña R.J. (2007). Enhancing the mineral and vitamin content of wheat and maize through plant breeding. *Journal of Ceral Science* **46** 293-307
- Parr A.J.y Bolewll G.P. (2000). Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of Science Food Agricultural*. **80** 985-1012
- Pedrero Z, Madrid Y, 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

- Pilon-Smits EAH, Hwang S, Mel Lytle C, Zhu Y, Tai JC, Bravo CR, Chen Y, Leustek T, Terry N (1999) Overexpression of ATP sulfurylase in Indian Mustard leads to increased selenate uptake, reduction, and tolerance. *Plant Physiology*. **119** 123-132
- Poletti S.; Gruissem W.; Sautter C. (2004). The nutritional fortification of cereals. *Current Opinion in Biotechnology*. **(15)** 162-165
- Querioz C.G.S.; Alonso A.; Mares-Guía M.; Magalhaes A.C. (1998). Chilling-induces changes in membrane fluidity and antioxidant enzyme activities in *Coffea Arabica* L. roots. *Biologia Plantarum*. **41** 403-413
- Rice-Evans C. A. (2000). Measurement of total antioxidant activity as a marker of antioxidant status *in vivo*: procedures and limitations. *Free Radical Biology and Medicine*. **33** 559-566.
- Rivero R.M.; Ruiz J.M.; Garcia P.C.; López-Lefebvre L.R.; Sánchez E.; Romero, L. (2001). Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Science*. **160** 315-321
- Rosales M.A.; Ruiz J.M.; Hernández J.; Soriano T.; Castilla N.; Romero L. (2006). Antioxidant content and ascorbate metabolism in cherry tomato exocarp in relation to temperature and solar radiation. *Journal of Science Food Agricultural*. **86** 1545-1551
- Ruiz JM, López-Cantarero I, Rivero RM, Romero L (2003) Sulphur phytoaccumulation in plant species characteristic of gypsiferous soils. *International Journal Phytoremediation*. **5**(3) 203-210
- Sairam R.K.; Veerabhadra K.; Srivastava G.C. (2002). Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science*. **163** 1037-1046
- Saito K, Kurosawa M, Tatsuguchi K, Takagi Y, Murakoshi I (1994) Modulation of cysteine biosynthesis in chloroplasts of transgenic tobacco overexpressing cysteine synthase [O-acetylserine(thiol)lyase]. *Plant Physiology*. **106** 887-895

- Salin M.L. (1989). Toxic oxygen species and protective system of the chloroplast. *Physiologia Plantarum*. **72** 681-689
- Scandalios J.; Alexios N. (1999). Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione S-transferase gene expression in the maize. *Physiologia Plantarum*. **106** 112-120
- Schleiser K.; Harwat V.; Böhm V.; Bitsch R. (2002). Assesment of antioxidant by using different in vitro methods. *Free Radical Research*. **36 (2)** 177-187
- Shahidi F.; Wanasundara P. K. J. P. D. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Reviewa in Food Science and Nutriton*. **32** 67-103.
- Smaling E.M.A.; Oenema O.; Fresco L.O. (1999). *Nutrient disequilibria in agroecosystems: concepts and case studies*. CABI Publishing
- Smirnoff N. (1996). The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany*. **78** 661-669
- Smith I.K.; Vierheller T.L.; Thorne C.A. (1989). Properties and function of glutathione reductase in plants. *Physiologia Plantarum*. **77** 449-456
- Smith-Becker J.; Marois E.; Huguet E.J.; Midland S.L.; Sims J.J.; Keen N.T. (1998). Accumulation on salicylic acid and 4-hydrobenzoic acid in phloem fluids of cumcuber during systemic resistance is preceded by a transient increase in phenylalanine ammonia-lyase in petioles and stem. *Plant Physiology*. **116** 231-238
- Smokolji P, Pograje L, Hlaston-Ribic C, Stibilj V (2005) Selenium content in selected Slovenia foodstuffd and stimated daily intakes of selenium. *Food Chemistry*. **90** 691-697
- Spallohlz J.E. (1994). On the nature of selenium toxicity and carcinostotic activity. *Free Radical Biological and Medical*.**17** 45-64
- Stein A.J.; Nestel P.; Meenakshi J.V.; Qaim M.; Sachdev H.P.S.; Bhutta Z.A. (2006). Plant breedingto control zinc deficiency in India: how cost-effective is biofortification?. *Publc Health Nutition*. **10 (5)** 492-501

- Strid J.P. y Desborough S.L. (1993). Alteration in expression of defence genes in *Pisum sativum* after exposure to supplementary ultraviolet-B radiation. *Plant Cell Physiology*. **34** 949-953
- Stuvier CEE, De Kok LJ (2001) Atmospheric H₂S as sulphur source for Brassica oleracea: Kinetics of H₂S uptake and activity of O-acetylserine(thiol)lyase as affected by sulphur nutrition. *Environmental and Experimental Botany*. **46** (1) 29-36
- Teramura A.H.; Tevini M.; Wanzik W. (1984). Effect of ultraviolet-B irradiance on plants during mild water stress. Vol III. Effect on photosynthetic recovery and growth in soybean. *Physiologia Plantarum*. **50** 380-389
- Tevini M. y Teramura A.H. (1989). UV-B effects on terrestrial plants. *Photochemistry and Photobiology*. **50** 479-487
- Tevini M.; Wanzik W.; Teramura A.H. (1983). Effect of ultraviolet-B irradiance on plants during mild water stress. Vol II. Effect on growth, protein and flavonoid content. *Pflanzenphysiology*. **110** 459-467
- Tinggi U. (2003). Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australian: a review. *Toxicological Letters*. **137 (1-2)** 103-111
- Tudela J.A.; Cantos E.; Espín J.C.; Tomás-Barberán F.A.; Gil M.I. (2002). Induction of antioxidant flavonol biosynthesis in fresh-cut potatoes. Effect of domestic cooking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **50** 5925-5931
- Underwood B.A. (1999). Micronutrient deficiencies as a public health problem in developing countries and effectiveness of supplementation, fortification, and nutrition education: is there a role for agriculture? In *Improving Human Nutrition Through Agriculture: The role of International Agriculture Research International Food and Policy Research Institute (IFRPI)*. Washington, DC
- Van Camp W.; Van Montagu M.; Inzé D. (1994). Superoxide dismutase. En: Foyer C.H.; Mulleneaux P.M. (eds.) *Causes of photooxidative stress and amelioration of defence system in plants*. CRC Press, Boca Raton, FL 318-341

- Velu G.; Rai K.N.; Muralifahrn V.; Kulkarni V.N.; Longvah T.; Raveendran T.S. (2007). Prospect of breeding biofortified pearl millet with high grain iron and zinc content. *Plant Breeding*. **126** 182-185
- Welch R.M. (1986). Effect of nutrient deficiencies on seed production and quality. *Adv. Plant Nutr.* **2** 205-247
- Welch R.M. (2002). Breeding strategies for biofortificated staple plant food to reduce micronutrient malnutrition globally. *The Journal of Nutrition*. **132 (3)** S495-S499
- Welch R.M. y Graham R.D. (2004). Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. *Journal of Experimental Botany*. **55** 353-364
- West J.K. y Caballero B. (2001). Nutrition. En. Gaithersburg M.D.; Merson B.; Black R.; Mills A. A. (eds). *Diseases, programs, system and policies*. 207-291
- White P.J. y Broadky M.R. (2005). Biofortifying crops with essential mineral elements. *Trends of Plant Science*. **10** 586-593
- White PJ, Bowen HC, Parmaguru P, Frizt M, Spracklen WP, Spilby RE, Meacham MC, Mead A, Harriman M, Trueman LJ, Smith BM, Thomas B, Broadley MR (2004) Interactions between selenium and sulphur nutrition in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*. 55:1927-1937
- White PJ, Broadley MR (2005) Biofortifying crops with essential mineral elements. *Trends Plant Sci* 10:586-593
- Whitelegge J.P.; Koo D.; Diner B.A.; Domian I.; Erickson J.M. (1995). Assembly of the photosystem-II oxygen-evolving complex is inhibited in psba site-directed mutants *Chlamydomonas reinhardtii* aspartate-170 of the D1 polypeptide. *Journal of Biol. Chem* **27** 225-235
- Wirtz M, Droux M (2005) Synthesis of sulfur amino acids: cysteine and methionine. *Photosynthesis Res* 86:345-362

- Ximénez-Embún P.; Alonso I.; Madrid-Albarrán Y.; Cámara C.; (2004). Establishment of Selenium uptake and species distribution in Lupine, Indian Mustard and Sunflowers plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **52** 832-838
- 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 Science Food Agricultural*. **83** 451-455
- Xue T.; Hartikainen H.; Piironen V. (2001). Antioxidative and grown-promoting effect of selenium on senescing lettuce. *Plant and Soil*. **237** 55-61
- Yang X.E.; Chen W.R.; Feng Y. (2007). Improving human micronutrient nutrition through biofortification in the soil-plant system: China as a case study. *Environmental Geochemistry Health*. **29** 413-428
- Zhao F.; McGrath S.; Gray C.; Lopez-Bellido J. (2007). Selenium concentration in UK wheat and biofortification strategies. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A* **146** S243-S253

