



ESPECIACIÓN QUÍMICA Y DISTRIBUCIÓN DE SELENIO EN PLANTAS DE TRIGO
CARACTERIZACIÓN DIRECTA MEDIANTE TÉCNICAS DE SINCROTRÓN

Beatriz Guerrero López

Tesis doctoral

Doctorado en Química

Director: Manuel Valiente Malmagro

Departamento de Química

Facultad de Ciencias

2013



Memoria presentada para aspirar al Grado de Doctor por

Beatriz Guerrero López

Visto bueno,

Manuel Valiente Malmagro

Bellaterra 08/07/2013



Los estudios que se recogen en la presente tesis han sido financiados con el soporte de:

- La **beca PIF** (Personal Investigador en Formación) concedida por la **UAB** bajo la tutela del Catedrático de Química Analítica **Manuel Valiente Malmagro**.

- El proyecto de investigación **DISMEC** (*Development of Direct and Indirect Chemical Speciation Methodologies for an Efficient Characterization of Polluted Systems*, CTQ2009-07432, 2010-2012) financiado por el **Ministerio de Educación y Ciencia de España**.

- El proyecto de investigación **CHEMSYNCR0** (Evolución Tecnológica de la Especiación Química. Tecnología Química y del Síncrotrón para la Caracterización y Desarrollo de Sistemas, CTM2012-30970, 2012-2014) financiado por el **Ministerio de Educación y Ciencia de España**.

Igualmente desearía agradecer:

- A la profesora **Mercè Llugany** de la **Unidad de Fisiología Vegetal de la UAB** por facilitarme sus laboratorios para llevar a cabo los experimentos de cultivo del trigo.

- Al profesor **Óscar Palacios** de la **Unidad de Química Inorgánica de la UAB** por su asesoramiento en el análisis de selenio por ICPMS.

- Al **ESRF** (*European Synchrotron Radiation Facility*, Grenoble, Francia) por la posibilidad de desarrollar los experimentos XAS en sus instalaciones, especialmente al beamline **BM-25** y sus responsables **Germán Castro** y **Jon Ander Gallastegui** por el asesoramiento técnico.

- Al **HASYLAB** (*Hamburger Synchrotronstrahlungslabor*, Hamburgo, Alemania) por disponer de sus instalaciones para llevar a cabo experimentos XAS en el beamline **CEMO** y su responsable técnico **Edmund Welter**.

- Al profesor **Gordon Brown Jr** del **Departamento de Geología y Ciencias Medioambientales de la Universidad de Stanford** (California, EEUU) por acogerme en su grupo durante 3 meses para especializarme en la aplicación de técnicas de radiación sincrotrón al análisis de muestras medioambientales.

- Al **SSRL** (*Stanford Synchrotron Radiation Laboratory*, California, EEUU) por facilitarme sus instalaciones para el desarrollo de los experimentos de μ -XAS *imaging* en el beamline **BL 2-3**. En especial, agradecer a **Joy Andrews** por el soporte experimental y a **Sam Webb** por el asesoramiento para utilizar los programas SIXPACK y SMAK.

- A los **CCITUB** (Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona) por su contribución en los análisis de nutrientes por **ICPOES** y al responsable de los mismos **Antoni Padró**.

Finalmente, se detallan los congresos y reuniones científicas en que han sido presentados los resultados de la presente tesis doctoral:

- **IV AUSE Meeting**. Poster: "*Selenium speciation in wheat tissues by XAS*". 15-18 septiembre, 2009. Barcelona (España).

- **ISMEC** (*International Symposium on Metal Complexes*). Comunicación oral: "*Synchrotron XAS techniques for direct Se speciation in wheat tissues*". 7-11 de junio, 2010. Bilbao (España).

- **PITTCON** (*Pittsburgh Conference*). Comunicación oral: "*Determination of Se distribution in wheat tissues*". 28 de febrero - 5 de marzo, 2010. Orlando (EEUU).

- Reunión "**Coordenades Tecnològiques. Alimentació i Sostenibilitat**". AcTEC (Asociación Catalana de Tecnología). Comunicación oral: "*Estudis Fisiològics i d'Especciació Química en Blat Enriquit en Seleni per a la Fabricació d'Aliments Funcionals*". 25 de noviembre, 2010. Barcelona (España).

AGRADECIMIENTOS

Los primeros agradecimientos son para mi director de tesis, Manolo, quien a pesar de sus miles de ocupaciones y las dificultades que eso supone, se comprometió, desde el primer día y hasta el último, y tan deseado día, con el trabajo aquí presente. No se puede decir que la tesis sea un camino de rosas, o quizá sí, pero añadiría un matiz, rosas llenas de espinas. En cualquier caso, hay que reconocer que cada pinchazo con una de esas espinas es lo que te motiva para seguir luchando cada día y para crecer tanto en lo profesional como en lo personal. Gracias, Manolo, por las espinas en el camino, es lo que más valoro de haber trabajado a tu lado.

Mercè, tu et mereixes més que un gràcies, mil gràcies! Pel teu suport experimental, professional i personal. Per les hores, hores i més hores que has dedicat a aquest treball que sense tu no hauria estat possible de cap de les maneres. Gràcies per descobrir-me l'apassionant món de la fisiologia vegetal, però sobretot gràcies per la teva immensa paciència i gran generositat.

Gracias Óscar por las ideas aportadas a la tesis, por tu colaboración desinteresada, por el tiempo dedicado a ello y, lo más importante, por el buen rollo que inspiras.

Gustavo, gracias por todos los momentos en GTS, por seguirme la corriente con todas mis excentricidades, por picarme, por hacerme reír y por aguantar mis llantos también, por los consejos en lo profesional y en lo personal, éstos últimos, los que más valoro. ¡Y que no se me olvide! Gracias por aquel video que cambió mi vida 😊 Y, para acabar, en plan ñoño, gracias por seguir ahí, a ti, a Paqui y a tus peques que son dos solazos.

A tooooooooooooooooooodos y cada uno de los miembros de GTS, que son muchos, con los que he compartido ya sea uno o mil momentos. Perquè som i serem sempre més que un grup, perquè les vivències a GTS es porten al cor per sempre.

Pili, por “la magia de la amistad”, no cambies nunca y vuelve pronto a casa. Marta, la alegría de la huerta. Montse Resina, la dama del G, ese pequeño lugar donde se han vivido tan grandes momentos. Angélica, no conozco a persona más dulce en el mundo, te deseo lo mejor a ti, a Claudio y a esa preciosidad que tienes de hija, Maca. Fran, el más caballeroso de GTS, gracias por tu energía y alegría. Amanda, arriba el *flower power*! Maria Dolors, eres un sol, siempre tan atenta. Olga, me encanta tu energía! Dzięk! Elena, un encanto, que estabas 6 meses aquí i 6 meses allá. Agustí, gracias por tu risa contagiosa. A la gente del D: Lluís, Berta, Patri, Julio y Jordi Macanás. A los demás profesores, Montse López, Cristina Palet y María Muñoz. Gracias también a unos cuantos más de la gran familia de GTS: Marc Campillo, Jaime, Anna Bernaus, Àngels Cano, Aleix (¡Que ahora es mi jefe! ¡Quién me lo iba a decir!), Enrique y Johannes. Y, para acabar, que este es interminable, y seguro que me dejo a alguien, a los que han venido de otros países a pasar una temporada en el grupo, especialmente, a Nadia, Rajaa, Jadranka y Corina. It has been a pleasure to meet you all and discover your cultures and way of life. Thank you all!

También quisiera dedicar unas líneas de agradecimiento a todo el personal del Departamento de Química: gente de otros grupos, profesores, personal de secretaria, personal de limpieza y mantenimiento, técnicos de planta... A todos ellos, gracias también!

Thanks to all the people that I met at Stanford, my time there was great thanks to them. Thanks to Cristina, Pablo, Camella, Lance, Matt, Meng, Andrew, Ray, Aaron, Solomon, Ana, Carling, Clement, Craig, Elise, Georg, Jett, Mary, Nate, Noah, Ricardo, Sammy, Seung Hee... another never ending list... Thanks! 😊

A mi familia, que me lo ha dado todo y que siempre están y estarán ahí. Mamá, que me has dado la vida y el cariño incondicional, gracias. Papá, mi Superman, por tu espíritu de superación, por tu fuerza y tu valor, te admiro. Daniiii, mi tete, el más guapo de la casa, gracias por ser como eres, por escucharme y por aguantarme cuando te riño, sabes que lo hago por tu bien 😊 Os quiero!

A mis amigos, PORQUE SON LOS MEJORES, Carol y Ferran, Anna y Edu, Pili (otra vez, es lo que tiene ser ex-compañera de trabajo y amiga a la vez), Cris y César, Cris y Clement, Jessy y Joan, mi monstruita Montse y a los que me olvide!

Diego, mi vida, que lo has sido todo para mi en los últimos dos años y medio, gracias por tu amor, tu cariño, por cuidarme cada día, cada hora, cada minuto y cada segundo que pasa, porque siempre estás ahí, porque eres parte de mi. Quiero que quede escrito que tu papel en esta tesis ha sido vital, gracias por tu compañía, tu apoyo, tu ayuda y por el descubrimiento del espacio de no separación que me fascinó! 😊 Gracias también por aguantarme todas las neuras, los llantos y las rabietas del largo y tedioso camino de escribir una tesis, porque te mereces el cielo entero por todo ello! Y porque sabes que sin ti, sin tus ánimos y confianza, la tesis no hubiera sido posible. La verdad es que da gusto y ha sido un placer escribir la tesis al lado de la persona que más quiero. Un BEAsito enorme por todo ello. Te quiero. Y a tu familia también, tu papi, tu mami y tu hermana que me acogen con tantísimo cariño en esa tierra, tu tierra, que quiero tanto, Zamora.

Y para acabar, quisiera asegurarme de no quedar mal con nadie, puesto que los agradecimientos de una tesis son la única sección del documento que todo el mundo lee y, en la mayoría de los casos, la única que se lee. Es por ello que, si crees que deberías estar aquí y me he olvidado de ti, perdóname primero y, después, gracias a ti también.

En realidad, ¿No sé para qué mil palabras de agradecimiento si es suficiente con una?

GRACIAS

GRÀCIES

THANKS

*A mis padres,
a mi hermano
y a mi vida, Diego*

RESUMEN

El selenio (Se) es un elemento esencial para los seres vivos a niveles de trazas, que, como la mayoría de elementos, puede ser tóxico a niveles relativamente altos o causar deficiencias a niveles muy bajos. Este elemento se encuentra en forma de compuestos orgánicos, como proteínas, y en forma inorgánica, como selenato y selenito. Su esencialidad se debe a la gran variedad de selenoproteínas con funciones de vital importancia para los seres humanos, los animales y las plantas. Al igual que otros nutrientes, la principal fuente de selenio para los seres humanos son los alimentos. Por este motivo, la utilización de alimentos ricos en selenio, especialmente en zonas con suelos pobres en este elemento, es una necesidad para la salud. Por otra parte, es bien conocido que la forma en que se administra el selenio puede afectar significativamente a su bioasimilación tanto en animales como en plantas.

Las plantas sintetizan selenoproteínas a partir del selenio que incorporan del suelo, donde se encuentra generalmente en forma inorgánica. El contenido de selenio depende de la riqueza del suelo de cultivo, motivo por el cual se enriquecen los suelos de regiones pobres en este elemento para evitar deficiencias que conlleven riesgos para la salud de la población. El trigo (*Triticum aestivum*) y sus productos derivados son una de las fuentes de selenio más importantes para los seres humanos y los animales. Así pues, es fundamental controlar el proceso mediante el cual se enriquecen los cultivos con selenio, especialmente los de trigo, sobre lo que versan los estudios que aquí se presentan.

Con el objetivo de evaluar estos procesos de biofortificación se lleva a cabo un cultivo hidropónico de trigo que se enriquece con distintas especies de selenio, concretamente, con selenito, selenato o una mezcla de ambas especies. Sobre las plantas que así se obtienen, se evalúa el efecto de la especiación del selenio suministrado al trigo (selenito, selenato o sus mezclas) a las formas que adopta el selenio en la planta así como la distribución de estas formas en la misma, para entender mejor los mecanismos de absorción y transporte del selenio y poder asesorar en la mejora de los procesos de cultivo relativos al enriquecimiento con selenio.

Los principales resultados obtenidos en este estudio implican que la forma de selenio con que se enriquece el cultivo inicialmente (selenito, selenato o ambas en cultivo mixto) y la cantidad total de selenio inicial en el medio hidropónico, definen los efectos del selenio en los parámetros fisiológicos y en la acumulación de selenio, micronutrientes y macronutrientes. Así por ejemplo, podemos indicar que el enriquecimiento con una mezcla equimolar (1 μM de selenio) de ambas especies, selenito y selenato, atenúa las toxicidades que se observan al aplicar las mismas especies separadamente.

Otro de los estudios recogido en esta memoria, se ha dirigido a evaluar los efectos de la utilización de selenio en medios de cultivo contaminados con mercurio. La posibilidad de poder minimizar la absorción de mercurio de estos medios tiene efectos beneficiosos para la planta. Conocer cómo responde la planta en estudio, el trigo, al estrés y toxicidad por mercurio es de vital importancia para proceder a la caracterización del efecto del selenio en la absorción del mercurio y evaluar sus posibles efectos beneficiosos. Es por este motivo, que previamente al estudio de absorción de mercurio en presencia de selenio, se realiza un estudio de la toxicidad del mercurio, siendo éste, el único elemento presente en el medio hidropónico. Posteriormente, se procede a los estudios combinados con selenio para tratar de observar efectos de mejora en la respuesta del trigo al estrés por mercurio. Finalmente, se determinan las diferencias de los distintos tratamientos para poder asesorar unas posibles condiciones de cultivo que maximicen la capacidad beneficiosa del selenio.

En este estudio, los resultados más significativos corresponden a la disminución significativa de absorción de mercurio en presencia de una concentración de selenio de 1 μM en forma de selenito, siendo esta especie potencialmente beneficiosa para las plantas de trigo. Por el contrario, el selenato da lugar a efectos fitotóxicos al incrementar notablemente la absorción de mercurio.

Por otro lado, se han aplicado con éxito técnicas basadas en radiación sincrotrón para la caracterización directa de la adsorción de selenio por las plantas. Ello ha supuesto un excelente complemento de los estudios de fisiología vegetal descritos anteriormente. Concretamente se ha aplicado la técnica XANES, para estudiar la especiación de selenio en las distintas partes del trigo enriquecido y, $\mu\text{-XAS imaging}$, para evaluar la distribución de selenio, mercurio y otros elementos de interés nutricional de las muestras procedentes de los estudios en presencia de mercurio.

Los resultados más relevantes de la aplicación de estas técnicas se resumen en haber aplicado satisfactoriamente la técnica XANES para la especiación directa de selenio en muestras de trigo enriquecidas. Para complementar los estudios, se ha aplicado el $\mu\text{-XAS imaging}$ para identificar correlaciones entre el selenio, el mercurio y otros micro y macronutrientes. Estos resultados han puesto de manifiesto una relación clara entre la composición de selenoaminoácidos en la planta y la composición en selenio en la disolución de cultivo hidropónico. Concretamente, se ha observado que la variación de la relación selenito/selenato en la solución hidropónica produce una variación en la relación de selenoaminoácidos SeCy/SeMet producida en la planta. En este sentido, relaciones más reductoras (predominancia de selenito) favorecen la presencia de SeCy al tener un estado de oxidación menor que SeMet. De esta forma se ha establecido la forma de sintonizar químicamente la producción de selenoaminoácidos específicos en las plantas de trigo. Esta sintonización, objeto de una patente, nos permitiría controlar la producción de selenoproteínas en la planta de trigo lo que conllevaría superar la deficiencia de estabilidad y reproducibilidad de dichos cultivos.

SUMMARY

Selenium (Se) is an essential element for living organisms at trace levels and, as most elements, can be toxic at relatively high levels or cause deficiencies at very low levels. This element is part of organic compounds such as proteins and inorganic forms as selenate and selenite. Its essentiality is due to the wide variety of selenoproteins with vital functions for humans, animals and plants. As other nutrients, the most important human source of selenium is food. For this reason, the use of foods rich in selenium, is important for health care especially in areas where soils are selenium deficient. Moreover, it is well known that the form in which selenium is administered can greatly affect its bioassimilation in both animals and plants.

Plants synthesize selenoproteins by the uptake of selenium from soils, where is usually found as inorganic forms. Therefore, selenium content of crops depends on quality of soil selenium richness. For this reason, there are poor selenium soils regions where an artificial enrichment is needed to prevent unhealthy deficiencies on the population. Wheat (*Triticum aestivum*) and its derivatives are one of the most important sources of selenium proteins for humans and animals. It is essential to control the process by which crops are enriched with selenium, especially concerning wheat, the cereal of concern in the present studies .

In order to evaluate these processes, a biofortification hydroponic culture of wheat is performed by enrichment with inorganic species of selenium, specifically, selenite, selenate or a mixture of both species. In the related harvested plants, the effect of selenium speciation (selenite, selenate or mixtures) was evaluated by determining the selenium forms and its distribution in plants. Therefore, a better understanding the absorption mechanisms and transport of selenium in wheat will result on most appropriate assessment concerning processes of selenium enrichment.

The main results obtained in this study reveal the form of selenium present in the growth medium (either selenite, selenate or both when using mixtures) and its initial concentration to determine the selenium effects in physiological parameters and selenium, micro and macronutrients accumulation. For instance, we can state that an enrichment with an equimolar mixture (1 μM selenium) of both species, selenite and selenate, attenuates the toxicity observed when applying the same concentration of these species individually.

A separate study included herein was focused to evaluate the effects of selenium in mercury contaminated culture media. The ability to minimize the absorption of mercury from a contaminated media has beneficial effects to the plant. The study includes a first step to know how the plant (wheat) responds to mercury stress and toxicity and a second step, with the study of how selenium affects mercury absorption to assess its possible benefits. Thus, the first experiments were carried out in absence of selenium and in presence of mercury in the hydroponic media. Then, experiments in presence of both selenium and mercury were done to observe the expected beneficial effects of

selenium against the uptake of mercury. Finally, differences between treatments were determined in order to define the growing conditions that maximize the beneficial ability of selenium.

With reference to this study, the most highlighting results correspond to the significant decrease in mercury absorption in the presence of 1 μM selenium as selenite, being this selenium specie potentially beneficial to wheat plants. By contrast, selenate showed phytotoxic effects significantly increasing mercury absorption.

On the other hand, synchrotron based techniques were successfully applied for the direct characterization of selenium absorption by plants as an excellent complement to the plant physiology studies described above. Specifically, XANES technique was applied to study the speciation of selenium in different parts of fortified wheat and $\mu\text{-XAS imaging}$, to evaluate the distribution of selenium, mercury and other nutrients in samples from the experiments where mercury was present.

It is important to highlight the successful implementation of synchrotron techniques, such as XANES to achieve the direct speciation of selenium-enriched wheat samples. Additionally, $\mu\text{-XAS imaging}$ was applied to identify correlations between selenium, mercury and other micro and macronutrients of interest.

These results have shown a clear relationship between plant selenoaminoacid composition and selenium speciation enrichment in the hydroponic solution. Specifically, it has been observed that the variation of selenite/selenate ratio in the hydroponic solution produces a variation in the selenoaminoacids ratio SeCys/SeMet produced by the plant. In this sense, when the ratio is more reducing (selenite predominance) the presence of SeCys is favored because it has a lower oxidation state compared with SeMet. In this way, it has been established a way to chemically tune selenoaminoacids production in wheat plants. This tuning is the subject of a patent on how to control selenoproteins production in wheat to overcome the stability deficiency and reproducibility of wheat crops.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN

1. El selenio y el trigo	3
2. La química del selenio	3
3. El selenio y la salud humana.....	4
4. El selenio y la alimentación	5
5. El trigo: <i>Triticum aestivum</i>	7
6. Objetivos generales.....	9
7. Contenido.....	10
8. Bibliografía	11

CAPÍTULO 1. Estudio de la respuesta fisiológica del trigo al enriquecimiento con selenio

1. INTRODUCCIÓN	15
1. 1. Cultivo hidropónico	15
1. 2. Especiación de selenio: selenito (SeO_3^{2-}) y selenato (SeO_4^{2-}).....	16
1. 3. Técnicas analíticas	18
2. OBJETIVOS	23
3. EXPERIMENTAL.....	24
3. 1. Material vegetal y condiciones de cultivo	24
3. 2. Tratamientos con selenio	26
3. 3. Preparación de la muestra para análisis.....	27
3. 4. Análisis de selenio total por ICP-MS.....	29
3. 5. Análisis de la composición nutricional.....	30
3. 6. Análisis de datos	31
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
4. 1. Efectos del selenio en el crecimiento y biomasa del trigo.....	32
4. 2. Concentración y distribución del selenio en las plantas de trigo	34
4. 3. Efecto del selenio en la absorción de nutrientes.....	37
4.3.1. Efectos en los macronutrientes	38
4.3.2. Efectos en los micronutrientes	42
5. CONCLUSIONES	44
6. BIBLIOGRAFÍA	45

CAPÍTULO 2. Estudio del efecto del selenio en la absorción de mercurio en trigo

1. INTRODUCCIÓN	51
1. 1. El mercurio (Hg).....	51
1. 2. La interacción entre el selenio y el mercurio.....	52
1. 3. Estudio hidropónico de la toxicidad del mercurio en trigo	53
1. 4. Técnicas analíticas	54
2. OBJETIVOS	57
3. EXPERIMENTAL.....	58
3. 1. Material vegetal y condiciones de cultivo	58
3. 2. Tratamientos con mercurio	59
3. 3. Tratamientos con mercurio y selenio	59
3. 4. Tinción vital	60
3. 5. Análisis de selenio y mercurio total por ICP-MS.....	61
3. 6. Análisis de la composición nutricional.....	62
3. 7. Análisis de datos.....	62
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
4. 1. Efectos del mercurio en los parámetros fisiológicos del trigo.....	63
4. 2. Efectos de la presencia simultánea de selenio y mercurio sobre los parámetros fisiológicos del trigo.....	66
4. 3. Efectos del selenio en la absorción de mercurio	70
4. 4. Efectos del mercurio en la absorción de selenio	72
4. 5. Efectos del selenio y el mercurio en la absorción de nutrientes esenciales.....	74
4.5.1. Efectos en los macronutrientes	76
4.5.2. Efectos en los micronutrientes	78
5. CONCLUSIONES	81
6. BIBLIOGRAFÍA	82

CAPÍTULO 3. Estudio de la adsorción y distribución de selenio y mercurio en trigo mediante técnicas de sincrotrón

1. INTRODUCCIÓN	89
1. 1. Historia de la radiación sincrotrón	89
1. 2. Naturaleza de la luz sincrotrón.....	91
1. 3. Espectroscopia de absorción de rayos X (XAS)	94
1. 4. <i>Bulk</i> XAS.....	95
1.4.1. <i>Setup</i>	95
1.4.2. Espectros XAS	97
1. 5. μ -XAS imaging.....	98
1.5.1. <i>Setup</i>	98
1.5.2. Imágenes μ -XAS	98
1. 6. Aplicaciones en muestras biológicas: especiación química.....	99

2. OBJETIVOS	103
3. EXPERIMENTAL.....	104
3. 1. Instalaciones sincrotrón	104
3. 2. Preparación de las muestras	105
3. 3. Análisis XAS.....	107
3. 4. Análisis μ -XAS imaging.....	108
3. 5. Tratamiento de resultados XAS	109
3. 6. Tratamiento de resultados μ -XAS imaging	110
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	112
4. 1. Especiación de selenio en trigo mediante técnicas XAS	112
4.1.1. Compuestos de referencia de selenio	112
4.1.2. Validación del análisis de especiación	113
4.1.3. Muestras de trigo enriquecidas con selenio	115
4. 2. Distribución de selenio y mercurio por μ -XAS imaging	122
5. CONCLUSIONES	131
6. BIBLIOGRAFÍA	133
CONCLUSIONES.....	137
ANEXOS.....	143

INTRODUCCIÓN

1. El selenio y el trigo	3
2. La química del selenio.....	3
3. El selenio y la salud humana	4
4. El selenio y la alimentación.....	5
5. El trigo: <i>Triticum aestivum</i>	7
6. Objetivos generales	9
7. Contenido	10
8. Bibliografía.....	11

1. El selenio y el trigo

El selenio (Se) es un elemento traza esencial para los seres humanos debido a la gran variedad de selenoproteínas con funciones de importancia vital, las cuales se encuentran en los alimentos y son la principal fuente de selenio para los humanos dado que nuestro cuerpo no tiene la capacidad metabólica de sintetizarlas de forma natural.^{1,2}

La gran variedad de especies orgánicas e inorgánicas que existen de selenio hacen que su química sea de una complejidad elevada especialmente en el medio ambiente y los sistemas biológicos. Es por este motivo que la caracterización de las especies de selenio es necesaria a nivel biológico para entender mejor el papel de este elemento en procesos metabólicos, toxicológicos, nutricionales y medioambientales.³

Los cereales son una de las principales fuentes de selenio en la alimentación. Los campos de cultivo pueden ser originalmente ricos en selenio o bien ser enriquecidos antropogénicamente por la adición artificial de selenio inorgánico.⁴ Los enriquecimientos artificiales son necesarios en lugares donde los suelos no son ricos en selenio y su población es más vulnerable a sufrir deficiencias minerales y las enfermedades que puedan derivar.⁵ Plantas como el trigo (*Triticum aestivum*), son capaces de acumular selenio y transformarlo en compuestos bioactivos de este elemento de gran interés nutricional.⁶ En consecuencia, el trigo es un buen candidato para la investigación del proceso de bioasimilación de selenio al exponer esta especie vegetal a un enriquecimiento artificial, por lo que lo hemos seleccionado en nuestro estudio.⁷

Por otro lado, este elemento también es potencialmente interesante para ser aplicado en fitoremediación de mercurio en medios contaminados.^{8,9} Así pues, otro de los estudios desarrollados se ha basado en la evaluación de los posibles efectos fitoremediantes del selenio en la absorción de mercurio en trigo.

2. La química del selenio

En el año 1817 el selenio fue descubierto por Jöns Jakob Berzelius. Sus similitudes con el telurio (del latín *tellus*, tierra) fueron el motivo por el cual el nuevo elemento fue bautizado con

el nombre de selenio (del griego *σελήνη*, luna).¹⁰ Tiene propiedades metálicas y no metálicas y puede formar compuestos orgánicos e inorgánicos. Se puede encontrar en su forma más reducida (-2), la elemental (0) y en las formas oxidadas (+4 y +6). Hay seis isótopos naturales de selenio, de los cuales, cinco son estables: ⁷⁴Se, ⁷⁶Se, ⁷⁷Se, ⁷⁸Se y ⁸⁰Se. El ⁸²Se es radioactivo pero tiene un tiempo de vida largo y, en la práctica, puede considerarse estable.¹¹

El selenio, como muchos otros elementos, presenta un comportamiento ambivalente: por un lado, es un elemento traza esencial para los seres vivos, recomendándose una ingesta diaria de 50-200 µg pero, por otro lado, puede ser tóxico a niveles superiores a los necesarios para la salud, o bien, causar deficiencias a niveles inferiores. Las diferencias entre los límites que se establecen entre esencialidad, toxicidad y deficiencia son muy pequeños, lo cual dificulta los estudios en este terreno.³

3. El selenio y la salud humana

La esencialidad del selenio es debida a la gran variedad de selenoproteínas conteniendo selenoaminoácidos con funciones de importancia vital. En la Tabla 1 se muestran las selenoproteínas más conocidas y sus respectivas funciones.¹²

Tabla 1. Selenoproteínas humanas conocidas y sus funciones biológicas.

Selenoproteína	Función
Glutación peroxidasa, GPx (GPx1, GPx2, GPx3, GPx4)	Enzima antioxidante: elimina peróxidos de hidrógeno, lípidos y peróxidos fosfolipídicos, manteniendo la integridad de las membranas, modula la síntesis de eicosanoides, reduce la inflamación y la probabilidad de propagación de la degradación oxidativa de biomoléculas como los lípidos, las lipoproteínas y el DNA.
Selenoproteína encapsulada mitocondrial (Esperma)	Forma de glutación peroxidasa (PHGPx): protege el esperma de la degradación oxidativa y polimeriza dando lugar a una proteína estructural que da estabilidad y movilidad al esperma.
Yodotironinas de yodinasas	Producción de la hormona tiroidea activa T3 a partir de la tiroxina T4.
Selenofosfato sintetasa, SPS2	Requerida para la biosíntesis del selenofosfato, precursor de la selenocisteína.
Selenoproteína P	Se encuentra en el plasma y asociada a las células endoteliales, protegiéndolas de la degradación producida por el peroxinitrito.
Selenoproteína W	Necesaria para la función muscular.
Selenoproteína de la próstata (15 kDa)	Se encuentra en las células epiteliales de la próstata y tiene una función similar a la PHGPx.
Selenoproteína espermática (34 kDa)	Proteína con actividad similar a la GPx que se encuentra en el estómago y el esperma.
Selenoproteína de 18 kDa	Importante selenoproteína que se encuentra en el riñón y en muchos otros tejidos.

Concretamente en el caso del selenio, en base a una gran variedad de estudios, se ha establecido como puede afectar a la salud humana su deficiencia o exceso en la dieta. Algunos de estos efectos se resumen a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2. Efectos del selenio en funciones biológicas y enfermedades.

Funciones biológicas y enfermedades	Efectos del selenio
Sistema inmunitario	El selenio tiene efectos inmunoestimulantes. Las células del sistema inmunitario requieren selenoproteínas para su actividad.
Infecciones virales	Una dieta deficiente en selenio se asocia con la aparición, virulencia y progreso de algunas infecciones virales como el sida y la hepatitis B o C.
Reproducción	El selenio es esencial para la fertilidad masculina porque participa en la biosíntesis de testosterona y en la formación y desarrollo de los espermatozoides.
Estado de ánimo	Niveles bajos producen depresión u otros estados de ánimo negativos como ansiedad, confusión y hostilidad. El selenio es importante para el cerebro: cuando disminuyen los niveles de selenio en el cerebro este recibe un suministro prioritario, la deficiencia afecta a la velocidad de regeneración de algunos neurotransmisores, reduce el riesgo de sufrir ataques de epilepsia en niños y su deficiencia provoca problemas cognitivos en adultos.
Función tiroidea	Aunque la actividad de la desyodinasas está relativamente protegida a niveles bajos de selenio, el metabolismo de la hormona tiroidea se puede ver afectado. Se ha estudiado que la deficiencia combinada de yodo y selenio agrava el hipotiroidismo
Estrés oxidativo	El selenio de la GPx se comporta como un antioxidante y como antiinflamatorio. La reducción de peróxidos de hidrógeno, lípidos e hidroperóxidos fosfolipídicos, que evitan la propagación de radicales libres y especies oxigenadas reactivas; la reducción de hidroperóxidos intermedios de los ciclos de la ciclooxigenasa y la lipoxigenasa, disminuyendo la producción de prostaglandinas y leucotrienos que provocan inflamaciones; y la modulación de las alergias para la reducción de los peróxidos y superóxidos.
Cáncer	Se han realizados estudios epidemiológicos que evidencian que hay una relación inversa entre el consumo de selenio y la mortalidad por cáncer.

4. El selenio y la alimentación

La principal fuente de selenio para los seres humanos son los alimentos, dado que nuestro cuerpo no puede sintetizar las selenoproteínas con las funciones de importancia vital que se han descrito anteriormente. Por este motivo, hay un gran interés en el estudio del comportamiento y metabolismo de las distintas especies de selenio en los cultivos de plantas. Son las propias plantas las que pueden dar lugar a una gran variedad de alimentos a los cuales se les pueden atribuir características nutricionales excepcionales por estar enriquecidos con selenio, un elemento vital y esencial.

Alimentación y salud siempre han tenido una fuerte relación pero científicamente ha estado basada meramente en las características intrínsecas nutricionales de los alimentos y no en las posibilidades de modificar dichas características, por ejemplo, mediante el enriquecimiento en ciertos elementos esenciales. En los últimos años, el binomio alimentación-salud ha ido más allá de los beneficios nutricionales, pasando de una filosofía de “nutrición adecuada” a “nutrición óptima”.

Las plantas sintetizan selenoproteínas a partir del selenio que incorporan del suelo, generalmente en forma de selenatos y selenitos. Estas selenoproteínas contienen selenometionina (SeMet), una de las principales formas de selenio en cereales y otras plantas. El contenido de selenio de los alimentos depende de la riqueza del suelo de cultivo, motivo por el cual, es interesante enriquecer los suelos de regiones pobres.

Los selenatos y selenitos que asimilan las plantas son reducidos a seleniuro (Se^{2-}), proceso donde participa el glutatión. El Se^{2-} se transforma en selenocisteína (SeCys) y ésta en SeMet, mediante una vía similar a la que siguen las especies análogas de azufre. El selenio entra en la cadena alimentaria incorporándose en las proteínas de las plantas, generalmente en forma de los selenoaminácidos SeMet y SeCys. Estas dos especies pueden ser metabolizadas y se obtienen otras especies de selenio por distintas vías. El proceso metabólico que se acaba de detallar se presenta esquemáticamente en la Figura 1.¹³

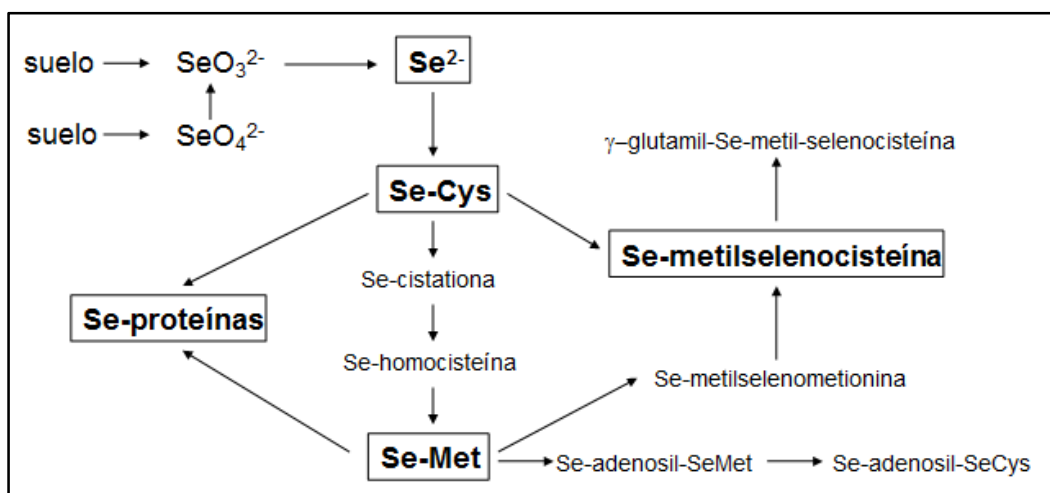


Figura 1. Representación esquemática del metabolismo del selenio en las plantas.

5. El trigo: *Triticum aestivum*

La palabra trigo proviene del latín *Triticum*, que significa quebrado, triturado o trillado, refiriéndose a la actividad de separar el grano de la cascarilla que lo recubre, para poder ser consumido. La especie de trigo más extensamente cultivada del mundo es *Triticum aestivum*, motivo por el cual se ha elegido esta especie para el desarrollo de los estudios llevados a cabo en la presente tesis. La clasificación científica de la especie se muestra en la Tabla 3. Genéticamente, dicha especie es una planta alohexaploide por tener 3 genomas repetidos idénticos que provienen de tres especies, lo cual confiere a esta planta una gran adaptabilidad agrícola a diferentes ambientes, adaptándose indistintamente a regiones cercanas al ártico como al ecuador, así como a niveles de altitud que van desde el nivel del mar, hasta llanos del Tíbet a 4000 m de altitud.¹⁴

Tabla 3. Clasificación científica (*T.aestivum*).



Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Orden	Poales
Familia	Poaceae
Subfamilia	Pooideae
Tribu	Triticeae
Género	<i>Triticum</i>
Especie	<i>T.aestivum</i>
Nombre binomial	<i>Triticum aestivum</i>

Desde la antigüedad, junto al maíz y el arroz, el trigo es una de los cereales más ampliamente consumidos. El trigo tiene una gran importancia a nivel mundial para la nutrición humana por ser la principal fuente de carbohidratos. El grano del trigo se convierte con facilidad en harina para la producción de una gran variedad de productos alimentarios como el pan, los productos de pastelería y la pasta, además de destinarse como aditivo para la cerveza y otros licores o para el consumo del ganado.

El trigo es el segundo cereal más producido mundialmente, siendo el primero el maíz y el tercero el arroz. En la Figura 2 se muestran los datos del volumen de producción de estos cereales en el año 2011 según datos de FAOSTAT y del *Grain Market Report* de 2012.^{15,16}

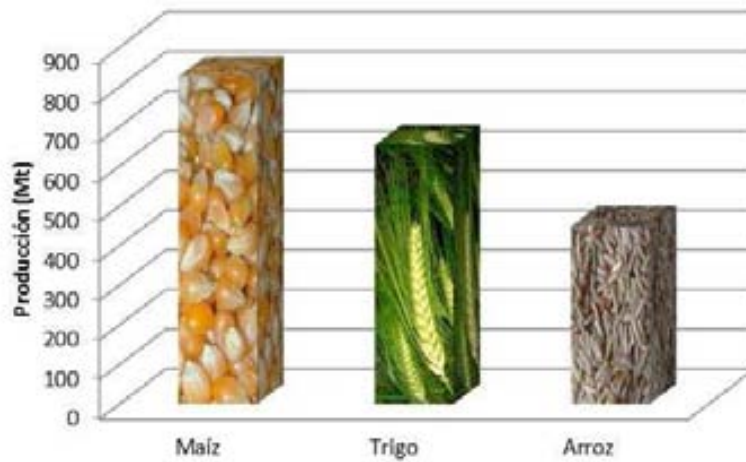


Figura 2. Producción estimada de maíz, trigo y arroz en el año 2012.

Por otro lado, para destacar la importancia de la producción de trigo a nivel nacional, en la Figura 3 se observa que si se comparan los kg de trigo que se producen por habitante en España, con los producidos en los tres países con mayor población del mundo (China, India y EEUU), según datos del año 2010 de FAOSTAT y del Banco Mundial,¹⁷ España se sitúa en segundo lugar, produciéndose 122 kg de trigo por habitante, pese a tener una población mucho menor y una producción de trigo en millones de toneladas muy inferior también.

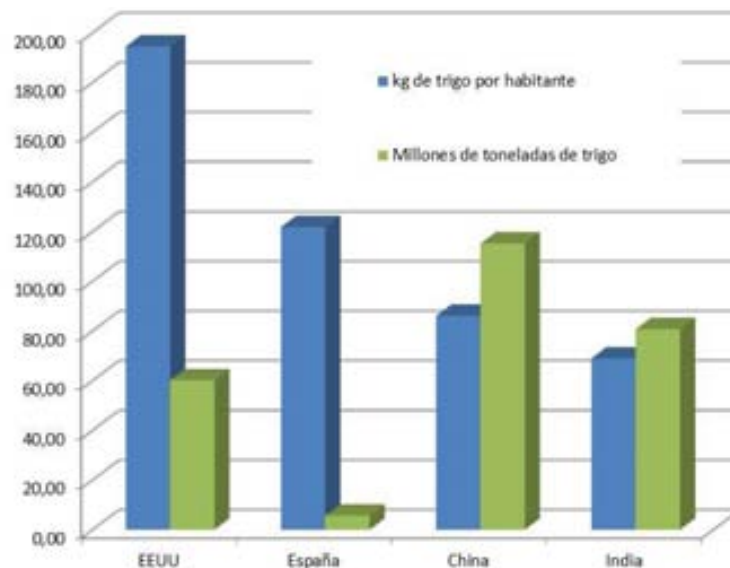


Figura 3. Producción de trigo 2010, FAOSTAT y World Bank Stat.

Teniendo en cuenta lo descrito anteriormente, podemos concluir que el selenio y el trigo constituyen un binomio de gran interés. En primer lugar, por la creciente importancia del selenio dadas sus propiedades beneficiosas para la salud y, en segundo lugar, por la importancia del trigo al ser una planta básica de gran producción y consumo humano.

6. Objetivos generales

Considerando los aspectos introductorios de la presente memoria, los estudios realizados tienen como finalidad el desarrollo de los siguientes objetivos principales:

OBJETIVO 1

Caracterizar los efectos fisiológicos en plantas de trigo producidos por la adsorción de selenio, en relación con las formas químicas de éste en la solución del cultivo hidropónico. Esta caracterización incluye la distribución de selenio en la planta y su influencia sobre la adsorción de macro y micronutrientes. Los resultados pueden indicar posibles estrategias para el enriquecimiento de trigo con selenio.

OBJETIVO 2

Determinación de los posibles efectos beneficiosos de la presencia de selenio en trigo frente a ambientes fitotóxicos y la influencia en dichos efectos de la forma química del selenio en la solución del cultivo hidropónico. Se toma el mercurio como agente fitotóxico en el cultivo de trigo. Los resultados podrían indicar posibles condiciones fitoremendiantes en estos ambientes fitotóxicos.

OBJETIVO 3

Determinar la especiación de selenio en el trigo tratado hidropónicamente mediante la aplicación de metodologías de especiación directa utilizando técnicas analíticas basadas en luz de sincrotrón. Dichas técnicas nos pueden facilitar información de gran utilidad para entender mejor la biodisponibilidad de elementos de gran interés como el selenio, por su potencial esencialidad, y el mercurio, por su conocida toxicidad, en matrices biológicas, más concretamente, en muestras vegetales.

7. Contenido

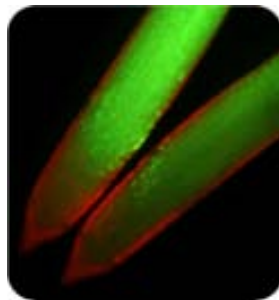
En base a la introducción general expuesta y con la finalidad de conseguir los objetivos planteados, se han desarrollado varios estudios que se han recogido en tres capítulos diferenciados, cuyo contenido se resume a continuación:

CAPÍTULO 1: Estudio de la respuesta fisiológica del trigo al enriquecimiento con selenio



El primer capítulo está basado en el estudio de los efectos del selenio en los parámetros fisiológicos del trigo (*Triticum Aestivum*), específicamente de la aplicación en cultivos hidropónicos de este elemento en sus dos formas inorgánicas selenito y selenato. Estos estudios permiten evaluar cómo afecta la especiación de selenio en su biodisponibilidad para entender mejor los mecanismos de absorción y transporte del selenio en el trigo que son clave en los procesos agronómicos de enriquecimiento.

CAPÍTULO 2: Estudio del efecto del selenio en la absorción de mercurio en trigo



Este capítulo presenta, en primer lugar, una evaluación del efecto de distintas concentraciones de mercurio sobre el crecimiento y los parámetros fisiológicos del trigo para así conocer la sensibilidad de esta planta al estrés por mercurio. Posteriormente, se evalúan los efectos beneficiosos del selenio aplicado al cultivo hidropónico en forma de selenito y selenato para finalmente identificar las diferencias de los distintos tratamientos que pudieran guiar la estrategia de cultivo más adecuada para maximizar la capacidad fitoremediante del selenio.

CAPÍTULO 3: Técnicas sincrotrón aplicadas al estudio de la distribución de Se y Hg en trigo



El capítulo se centra en la aplicación de técnicas basadas en radiación sincrotrón a la caracterización de muestras vegetales mediante la observación directa de las mismas. Concretamente, hemos aplicado XANES para determinar la especiación de selenio en el trigo enriquecido del capítulo 1 y poder evaluar así la mejor estrategia de enriquecimiento y, en segundo lugar, μ -XANES *imaging* para el estudio de la distribución de selenio, mercurio y macronutrientes de interés (K, Ca, S) para complementar la evaluación fisiológica de los efectos fitoremediantes del selenio en la inhibición de la absorción de mercurio estudiados en el capítulo 2.

8. Bibliografía

1. Ellis DR, Salt DE (2003) Plants, selenium and human health. *Curr Opin Plant Biol* 6:273-279.
2. Finley JW (2005) Selenium accumulation in plant foods. *Nut Rev* 63:196-202.
3. Polatajko A, Jakubowski N, Szpunar J (2006) State of the art report of selenium speciation in biological samples. *J Anal At Spectrom* 21:639-654.
4. Hawkesford MJ, Zhao FJ (2007) Strategies for increasing the selenium content of wheat. *J Cer Sci* 46(3):282-292.
5. Brown KM, Arthur JR (2001) Selenium, selenoproteins and human health: a review. *Pub Health Nut* 4:593-599.
6. Terry N, Zayed AM, de Souza MP, Tarun AS (2000) Selenium in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51:401-432.
7. Yan S (2013) Selenium-rich organism organic fertilizer and production method thereof, Chinese Patent, CN 101665384 B.
8. Zhu YG, Pilon-Smits EAH, Zhao FJ, Williams PN, Meharg AA (2009) Selenium in higher plants: understanding mechanisms for biofortification and phytoremediation. *Trends Plant Sci* 14(8):436-442.
9. Cuvín-Aralar ML, Furness RW (1991) Mercury and Selenium Interaction: A Review. *Ecotoxicol Environ Saf* 21(3):348-364.
10. Elementymology & Elements Multidict by Peter van der Krogt, [recurso en línea], <http://elements.vanderkrogt.net/element.php?sym=Se> [01/11/2011].
11. Coplen TB, Böhlke JK, De Bièvre P, Ding T, Holden NE, Hopple JA, Krouse HR, Lamberty A, Peiser HS, Révész K, Rieder SE, Rosman KJR, Roth E, Taylor PDP, Vocke RD Jr, Xiao YK (2002) Isotope-abundance variations of selected elements (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem* 74:1987-2017.
12. Fráusto da Silva JJR (2001) *The biological chemistry of the elements: the inorganic chemistry of life*. 2a edición, Oxford University Press, Oxford.
13. Dumont E, Vanhaecke F, Cornelis R (2006) Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. *Anal Bioanal Chem* 385:1304-1323.
14. Belderok B, Mesdag H, Dingena AD (2000) *Bread-Making Quality of Wheat*. Springer, Kluwer Academic Publishers, London.
15. FAOSTAT website, [recurso en línea], <http://faostat.fao.org/> [27/02/2012]
16. International Grains Council, *Grain Market Report* (2012) 419.
17. El Banco Mundial website, [recurso en línea], <http://datos.bancomundial.org> [27/02/2012].

CAPÍTULO 1

Estudio de la respuesta fisiológica del trigo al enriquecimiento con selenio

1. INTRODUCCIÓN	15
1. 1. Cultivo hidropónico.....	15
1. 2. Especiación de selenio: selenito (SeO_3^{2-}) y selenato (SeO_4^{2-})	16
1. 3. Técnicas analíticas.....	18
2. OBJETIVOS	23
3. EXPERIMENTAL	24
3. 1. Material vegetal y condiciones de cultivo.....	24
3. 2. Tratamientos con selenio.....	26
3. 3. Preparación de la muestra para análisis	27
3. 4. Análisis de selenio total por ICP-MS	28
3. 5. Análisis de la composición nutricional	30
3. 6. Análisis de datos	31
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
4. 1. Efectos del selenio en el crecimiento y biomasa del trigo	32
4. 2. Concentración y distribución del selenio en las plantas de trigo.....	34
4. 3. Efecto del selenio en la absorción de nutrientes	37
4.3.1. Efectos en los macronutrientes	38
4.3.2. Efectos en los micronutrientes	42
5. CONCLUSIONES.....	44
6. BIBLIOGRAFÍA	45

1. INTRODUCCIÓN

1. 1. Cultivo hidropónico

Como ya se ha comentado, el trigo está considerado una importante fuente de selenio para la dieta. Los estudios de los mecanismos del selenio relacionados con su absorción, metabolismo, translocación y acumulación en las plantas son trascendentales para disminuir los riesgos de toxicidad o deficiencia de los consumidores. El control de dichos mecanismos ayuda a seleccionar adecuadamente la mejor estrategia para biofortificar una planta.

Los estudios en cultivos hidropónicos están ampliamente aceptados, ya que al ser sistemas de cultivo en solución, permiten la adaptación a una gran variedad de tratamientos porque se controlan todos los parámetros deseados del medio de cultivo.^{1,2,3,4} Son sistemas fisiológicos que dan la oportunidad de estudiar deficiencias o excesos de nutrientes concretos individualmente, lo cual es de gran dificultad en cultivos en suelo.

Los cultivos convencionales están expuestos a variaciones estacionales, es decir, los productos derivados no pueden mantener una composición funcional constante debido a la influencia del clima de cada estación. Existen estudios especializados que demuestran que las precipitaciones, la humedad y la temperatura en determinados momentos del ciclo de crecimiento de un cultivo afectan drásticamente a los rendimientos de producción.^{5,6,7,8,9} El cultivo hidropónico es un método de cultivo que permite superar esta debilidad ya que permite regular la producción mediante el control, tanto de las condiciones climáticas, como de los parámetros físico-químicos. De esta manera se supera la variabilidad estacional de los cultivos para la producción de la planta en estudio.

Para conseguir un cultivo hidropónico óptimo, el sistema debe mantener adecuadamente la aireación en la zona de las raíces, proveer adecuadamente los nutrientes necesarios y mantener la integridad en los diferentes tratamientos. Los recipientes para el cultivo deben ser opacos para prevenir el crecimiento de algas y no deben contener compuestos orgánicos o inorgánicos que puedan ser fitotóxicos. El control de pH también es de gran importancia. Para evitar variaciones de pH a lo largo del período de crecimiento de la planta en nuestro estudio se ha utilizado el tampón orgánico MES (ácido morfolinoetanosulfónico).¹⁰

El cultivo hidropónico estático, es el que se ha llevado a cabo en el estudio de la presente tesis. Este tipo de sistemas son los más utilizados cuando los experimentos implican un número considerable de tratamientos distintos, ya que sería muy costoso llevar a cabo un sistema dinámico en el que el flujo de solución nutritiva es constante. Afortunadamente, el inconveniente de la variación de la concentración de nutrientes en el tiempo se soluciona renovando la solución nutritiva periódicamente durante el crecimiento de la planta.

Así pues, los cultivos hidropónicos nos dan una primera idea de cómo afecta a los parámetros de crecimiento fisiológico y la asimilación de macro y micronutrientes, el enriquecimiento, en este caso, del cultivo con diferentes especies de selenio.

El cultivo hidropónico de trigo del presente estudio, se ha enriquecido con selenio en forma de selenato de sodio (Na_2SeO_4), selenito de sodio (Na_2SeO_3) y ambas especies mezcladas a concentraciones iguales y equivalentes a las concentraciones individuales. Para determinar los efectos de la absorción de selenio en el trigo, se han monitorizado a lo largo del cultivo los parámetros de crecimiento, la distribución y concentración de selenio en planta y la absorción de micro y macronutrientes mediante técnicas analíticas como ICP-MS e ICP-OES.

1. 2. Especiación de selenio: selenito (SeO_3^{2-}) y selenato (SeO_4^{2-})

El selenito (SeO_3^{2-}) y el selenato (SeO_4^{2-}) son las dos formas mayoritarias de selenio disponible en los suelos y en la mayoría de estudios, se suministran a las plantas individualmente. No obstante, ambas especies pueden coexistir. Es por este motivo, que en el presente estudio no solo se han estudiado los efectos del enriquecimiento del cultivo con cada una de las especies por separado, sino que además, se han visto los efectos de la suplementación de ambas.

El selenato puede ser absorbido mediante los transportadores de sulfato dada su similitud química con este anión. En cambio, en el caso del selenito, se postula que los transportadores de fosfato juegan un papel importante. En consecuencia, la biodisponibilidad de selenato y de selenito en la solución nutritiva depende de la presencia de los iones competentes sulfato y fosfato.¹¹ La solución nutritiva de la mayoría de los estudios, contiene niveles de sulfatos similares a los encontrados en suelos, pero las

concentraciones de fosfatos son mucho más altas.¹² En varios estudios, el selenato compite con facilidad frente a la absorción de sulfato, en cambio, poco se sabe de la absorción de selenito que parece ser más pasivo frente a los transportadores de fosfato.^{13,14,15,16,17,18,19}

En este estudio, el selenito se encuentra en la solución nutritiva como HSeO_3^- dado que dicha solución se encuentra a pH 6,0, de tal manera, que se comporta como un ácido débil que compite con la absorción de fosfato. Por otro lado, está estudiado que la inhibición de la absorción de sulfato por selenato es más fuerte que la del fosfato por el selenito.¹¹ Teniendo en cuenta estos datos en los experimentos que se presentan, los niveles de ambos nutrientes (sulfatos y fosfatos) se han disminuido para evitar parte de esta competición, aunque la selectividad de los transportadores varía para cada especie de planta y su estatus nutricional.²⁰

Es bien conocido que los estados de oxidación del selenio dependen del pH y del potencial redox de los suelos en que se encuentra. Ambos parámetros dependen de varios factores, que pueden variar en función de las estaciones: la composición del suelo, la cantidad de agua y materia orgánica y la actividad bacteriana. En medios ácidos (pH 4,5-6,5) el selenito es la forma predominante de selenio, mientras que en medios básicos (pH 7,5-8,5) lo es el selenato, más soluble que el selenito.²¹ Con esto se demuestra que ambas especies pueden ser encontradas en diferentes tipos de suelos. Considerando que el selenito exhibe mayor toxicidad que el selenato, siendo el segundo, más soluble y, por tanto, con mayor biodisponibilidad para las plantas, la toxicidad del selenio también puede relacionarse con el potencial redox del suelo. Por estas razones, tanto el efecto de ambas especies individuales, como conjuntamente, debe ser considerado para conocer mejor los mecanismos de absorción de selenio, así como la toxicidad que puede suponer para las plantas dichas especies.

En el trabajo realizado, se ha expuesto la planta de trigo a las dos especies de selenio separadamente (selenito y selenato) y a ambas en conjunto, con el objetivo de estudiar el efecto de la especiación de selenio en la biodisponibilidad y para entender mejor los mecanismos de absorción, transporte, metabolismo, interacción con micro y macronutrientes, acumulación y tolerancia de la planta. Aunque ya hay algunos estudios en referencia a los efectos del selenio en la absorción de nutrientes esenciales, la interacción del selenio y dichos nutrientes todavía no está definida.^{19,22,23} Es interesante añadir que la presencia de las dos especies de selenio en un mismo experimento y sus efectos en la

absorción de nutrientes no ha sido estudiada en profundidad en cultivos de trigo, lo cual da primicia al presente estudio.

1. 3. Técnicas analíticas

El trabajo experimental llevado a cabo en la investigación del presente estudio ha requerido del uso del instrumental analítico cuyas características y aplicación concreta se detallan en la

Tabla 1.

Tabla 1. Características del instrumental analítico y aplicaciones.

EQUIPO	MICROONDAS ANALÍTICO	ICP-MS (Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry)	ICP-OES (Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry)
Modelo	MARS 5	PQExcell y XSeries	Optima 3200RL
Marca	CEM	Thermo	Perkin Elmer
País	EEUU	Reino Unido	EEUU
Laboratorio	GTS-UAB	GTS-UAB	SCT-UB
Aplicación	Digestión ácida del material vegetal	Análisis cuantitativo de selenio en el material vegetal	Análisis cuantitativo de micro y macronutrientes en el material vegetal
Imagen			

1.7. 1. Microondas analítico

La digestión en microondas analítico es un proceso mediante el cual se calientan las muestras sólidas en un disolvente aplicando energía microondas. Este tipo de tratamiento es una técnica ampliamente utilizada para disolver muestras biológicas que requieren un posterior análisis de elementos traza, como es el caso del selenio en el presente estudio.²⁴

La muestra se calienta, ya que el agua u otros líquidos polares absorben la energía microondas rápidamente. El aumento de la presión de vapor que se genera en los recipientes de microondas, resulta en el incremento del punto de ebullición de los ácidos empleados, por lo que se pueden lograr altas temperaturas, suficientes para la

descomposición de la matriz en poco tiempo, sin necesidad de recurrir a mezclas complejas y de difícil manipulación.

Los equipos de microondas suelen estar equipados con una placa giratoria para la distribución homogénea de la energía. El magnetrón que genera la radiación microondas suele ser de 24,55 MHz y la potencia suministrada varía entre 300 y 1200 W. Las muestras se ponen en vasos de PFA (perfluoroalcoxicompuestos) que pueden llegar a soportar 350 psi de presión interna y son transparentes a la radiación microondas. Estos vasos

tienen una membrana de seguridad que se rompería en caso de sobrepresión. Uno de los vasos, el de control, lleva conectados un sensor de presión (0-350 psi) y otro de temperatura (0-210 °C) que permiten controlar estos dos parámetros durante el transcurso de la digestión. Además, cada vaso contiene un agitador magnético para mejorar el proceso de digestión (ver Figura 1).²⁵

Esta técnica de digestión tiene varias ventajas en comparación con los métodos convencionales: es rápida, requiere poco disolvente, permite el control de los parámetros de extracción, tiene agitación simultánea, permite trabajar a elevadas temperaturas, hay menos probabilidad de contaminación de muestra y se pueden procesar varias muestras de la misma naturaleza simultáneamente.^{26,27}

1.7.2. ICP-MS

El espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente, ICP-MS, es una técnica analítica multielemental. Mediante una fuente de plasma, se disocia la muestra en los átomos que la constituyen, los cuales después de ser ionizados, se separan en función de su relación masa/carga en el cuadrupolo y llegan finalmente al detector. Este equipo permite la determinación de todos los elementos de la tabla periódica que tengan un potencial de ionización menor que el argón, con límites de detección muy bajos, en algunos casos llegando a ser de ppt. En la Figura 2 se observa un esquema de los componentes del equipo.

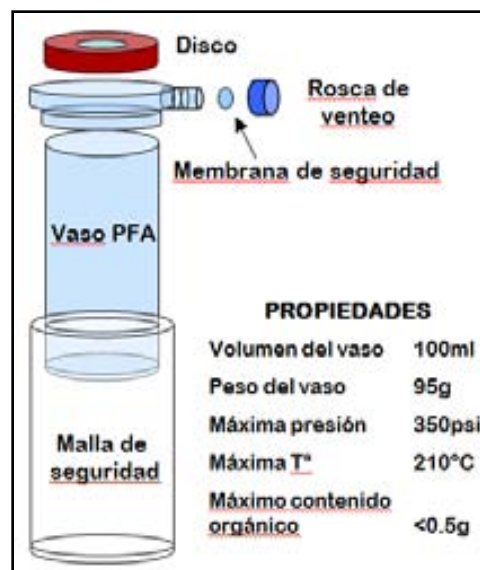


Figura 1. Esquema de los componentes de un vaso de PFA para microondas analítico.

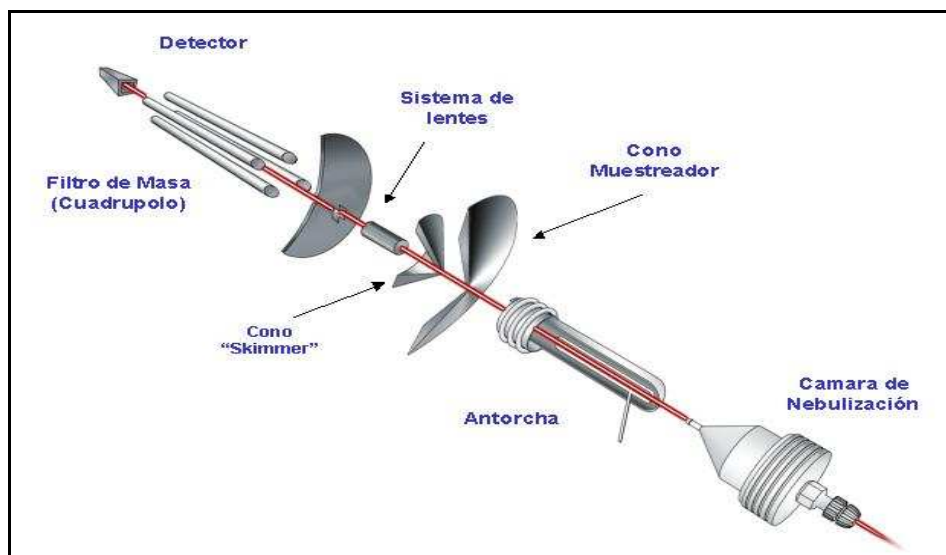


Figura 2. Esquema de los componentes del ICP-MS.

Los procesos que tienen lugar durante el análisis son los siguientes:

1. Introducción de la muestra: las muestras líquidas llegan al nebulizador mediante una bomba peristáltica.

2. Nebulización: la muestra líquida se transforma en aerosol. La cámara de nebulización está refrigerada por un sistema Peltier a 4 °C.

3. Ionización: la muestra nebulizada se ioniza en el plasma.

4. Muestreo: los iones que se crean en el plasma se introducen en el espectrómetro de masas mediante una interfase que separa la zona de presión atmosférica (ICP) de la zona de vacío (MS). La interfase está formada por el cono muestreador, donde se llega a 2 mbar, y el cono *skimmer*, que alcanza los 10^{-6} mbar.

5. Focalización: superada la interfase, se llega al sistema de lentes, donde se genera un campo electrostático que focaliza los iones en dirección al cuadrupolo.

6. Filtrado: la aplicación de un voltaje determinado en el cuadrupolo hace que los iones con una determinada relación masa/carga mantengan su trayectoria estable y lleguen al detector.

El equipo dispone de celda de colisión (CCT) que presuriza la guía de iones con un gas inerte, en este caso se ha utilizado hidrógeno. El uso de la CCT permite la atenuación selectiva de iones poliatómicos como el dímero de argón ($^{40}\text{Ar}^{2+}$) que tiene la misma masa que el isótopo ^{80}Se , el más abundante del selenio, la cual cosa mejora notablemente los límites de detección para este elemento y minimiza su interferencia.^{28,29,30}

1.7.3. ICP-OES

El espectrómetro de emisión óptica por plasma acoplado inductivamente, es la técnica que se ha utilizado para la determinación de micronutrientes y macronutrientes en el material vegetal. En esta técnica analítica, se utiliza como fuente de excitación de los átomos, un plasma de argón iniciado mediante una chispa que genera iones Ar^+ y electrones en una antorcha (ver Figura 3). El plasma se mantiene por acción de una corriente inducida por radiofrecuencia, a través de una bobina que rodea la antorcha, pudiendo producir 2 kW de potencia a unos 27 MHz, el cual genera un campo oscilante que hace que las partículas cargadas fluyan en caminos anulares cerrados, generando calor por efecto Joule como consecuencia de la resistencia a su movimiento.

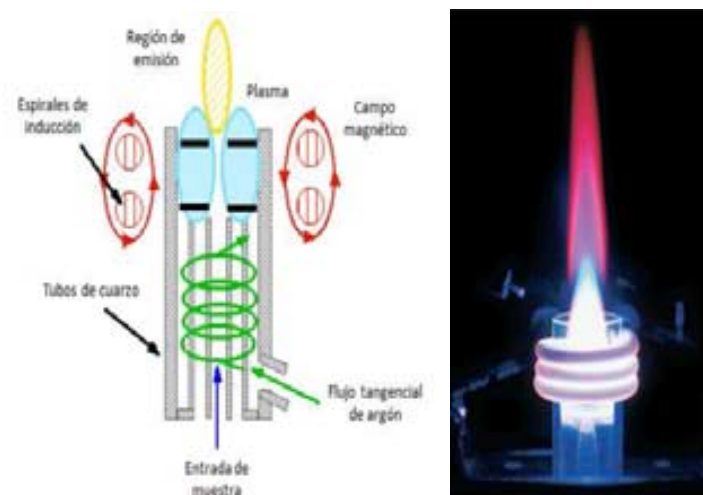


Figura 3. Esquema e imagen de la antorcha del ICP-OES.

Dado que la temperatura generada está en torno a 6000-10000 K, es necesario un aislamiento externo de la antorcha. Este aislamiento se produce con un flujo de argón tangencial que se puede ver en la Figura 3. La introducción de la muestra en el plasma se realiza en forma de un aerosol generado en un nebulizador mediante un flujo de argón de 0,3 a 1,5 l/min a través de la parte central de la antorcha. Una vez en el plasma, el aerosol se desolvata, se volatiliza, se atomiza y se ioniza. Posteriormente, las especies iónicas y atómicas excitadas sufren una relajación, emitiendo una radiación característica que es recogida en un detector (un tubo fotomultiplicador), lo que permite cuantificar los analitos. Las principales ventajas de esta técnica de análisis respecto a otras técnicas de emisión son la mayor reproducibilidad de las condiciones de atomización, la posibilidad de determinar

muestras con niveles de concentración muy diferentes (varios órdenes de magnitud), la mayor selectividad, menores interferencias y la posibilidad de analizar diferentes elementos sin variar las condiciones de excitación debido a la elevada temperatura de atomización.^{31,32,33}

2. OBJETIVOS

En el presente capítulo se establecen los siguientes objetivos:


1. Determinación del efecto de selenito y selenato sobre el crecimiento y los parámetros fisiológicos del trigo.
2. Conocer cómo afecta la presencia de selenio en sus diferentes formas, a la absorción, translocación y acumulación de los micronutrientes y macronutrientes esenciales para el crecimiento del trigo.
3. Análisis de la respuesta del trigo a las distintas estrategias de enriquecimiento con selenio, dando énfasis a la posible dualidad de las especies selenito y selenato al ser combinadas en un mismo cultivo.

3. EXPERIMENTAL

3. 1. Material vegetal y condiciones de cultivo

La especie vegetal *Triticum aestivum* cv. Pinzón se ha adquirido en la empresa española Semillas Fitó S.A. y ha sido la utilizada en el presente estudio como trigo bien conocido por su alta calidad para la fabricación de harinas. Las características y los motivos de siembra que define el fabricante se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Características y motivos de siembra del trigo *Triticum aestivum* cv. Pinzón de Semillas Fitó S.A.

	Características	Motivos de siembra
	<ul style="list-style-type: none"> • Trigo blando, alternativo • Espiga aristada • Alta calidad, W > 350 • Peso hectolitro elevado • Características organolépticas regulares • Índice de proteína muy alto 	<ul style="list-style-type: none"> • Trigo muy apreciado por su calidad harinera • Sobrevaloración económica en el mercado • Rendimientos medios • Buena sanidad • Especialmente indicado para siembras tardías

El primer paso para llevar a cabo el cultivo consiste en la germinación. Para ello, las semillas del trigo se ponen a germinar en rollos de papel de filtro húmedos que se colocan en un vaso de precipitados verticalmente con las semillas en la parte superior y se incuban durante 3 días a una temperatura constante de 25 °C en baja intensidad lumínica. En la Figura 4 se ve el inicio y el final del proceso de germinación descrito.

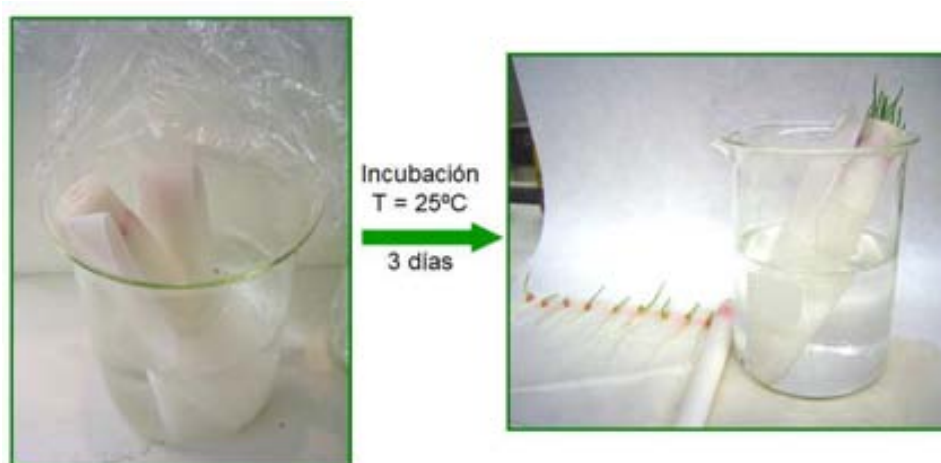


Figura 4. Proceso de germinación en papel de filtro húmedo de las semillas de trigo.

El segundo paso consiste en poner un soporte de espuma alrededor de las plántulas germinadas en la zona que separa hoja de raíz para colocar cada planta en los contenedores de plástico opaco de 1 L donde se llevará a cabo el cultivo hidropónico.

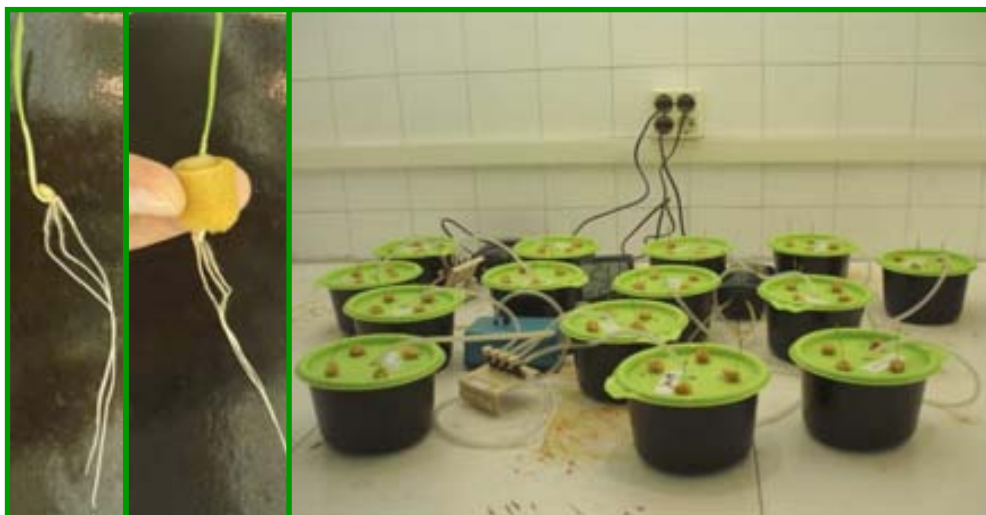


Figura 5. Montaje del cultivo hidropónico.

En estos contenedores las plantas se aclimatan y dejan crecer durante un periodo de una semana con solución nutritiva Hoagland $\frac{1}{4}$, la composición química de la cual se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Composición de la solución nutritiva Hoagland $\frac{1}{4}$.

Compuesto	Concentración*
KNO ₃	1,0 mM
Ca(NO ₃) ₂	1,0 mM
MgSO ₄	0,25 mM
K ₂ HPO ₄	0,5 mM
MnCl ₂	2,0 μM
H ₃ BO ₃	3 μM
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0,1 μM
ZnSO ₄	2 μM
CuSO ₄	1 μM
FeNa-EDTA	60 μM
MES (ácido morfolinoetanosulfónico)	2 mM

*La disolución se ajusta a pH 6.0 con KOH.

Tras ello las plantas se exponen durante 5 días a los distintos tratamientos con selenio. El proceso de montaje de cultivo hidropónico completo se muestra en las imágenes de la Figura 5 y en la Figura 6 se muestra una imagen del final del cultivo.



Figura 6. Imagen del final del cultivo hidropónico.

La solución de los contenedores del cultivo se airea continuamente y se renueva dos veces durante el periodo de crecimiento. El cultivo hidropónico se lleva a cabo en una cámara de cultivo controlada en las condiciones que se detallan a continuación: aireación constante de la solución nutritiva, fotoperiodo de 16 h día y 8 h noche, temperatura de 24 °C día y 18 °C noche e intensidad de luz de $320 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, condiciones adecuadas para una planta tipo C3 temperada como es el trigo.

3. 2. Tratamientos con selenio

El enriquecimiento de selenio se realiza mediante la adición de selenio a la solución nutritiva Hoagland $\frac{1}{4}$ utilizando disoluciones de las sales sódicas de las especies de selenio estudiadas: selenito de sodio ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, >99%, PA, Merck, Alemania) y selenato de sodio (Na_2SeO_4 , >98%, PA, Fluka, Suiza). Cada contenedor plástico donde se realiza cada uno de los experimentos de enriquecimiento hidropónico, contiene tres plantas de trigo y se realiza por duplicado. Adicionalmente, el cultivo hidropónico completo, es decir, la totalidad del experimento, se realiza por duplicado.

Se realizan cultivos hidropónicos para cada una de las especies de selenio individuales y para la combinación de ambas en un mismo cultivo a los siguientes niveles de concentración: 1, 10, 50 y 100 μM de selenio en forma de selenito y selenato. Es importante destacar, que en el caso de los cultivos mixtos, se mezclan concentraciones equivalentes de cada una de las especies para conseguir las concentraciones totales de selenio en estudio, por ejemplo, el cultivo mixto 1 μM de selenio como selenito y selenato contiene 0,5 μM de selenio en forma de selenito y 0,5 μM de selenio en forma de selenato. De esta manera, tanto los cultivos individuales, como los mixtos, siempre tienen la misma concentración total de selenio, condición que imponemos para una mejor comparabilidad de los resultados.

La descripción detallada de la composición química y la referencia con la que se identificará cada cultivo en la presente tesis se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Descripción y nomenclatura de los cultivos enriquecidos con selenio.

Especie de Se	Descripción de la composición química del cultivo enriquecido	Referencia
Selenito SeO_3^{2-}	1 μM de selenio en forma de SeO_3^{2-}	1 SeO3
	10 μM de selenio en forma de SeO_3^{2-}	10 SeO3
	50 μM de selenio en forma de SeO_3^{2-}	50 SeO3
	100 μM de selenio en forma de SeO_3^{2-}	100 SeO3
Selenato SeO_4^{2-}	1 μM de selenio en forma de SeO_4^{2-}	1 SeO4
	10 μM de selenio en forma de SeO_4^{2-}	10 SeO4
	50 μM de selenio en forma de SeO_4^{2-}	50 SeO4
	100 μM de selenio en forma de SeO_4^{2-}	100 SeO4
Mezcla SeO_3^{2-} y SeO_4^{2-}	1 μM de selenio: 0,5 μM en forma de SeO_3^{2-} y 0,5 μM en forma de SeO_4^{2-}	0.5+0.5
	5 μM de selenio: 5 μM en forma de SeO_3^{2-} y 5 μM en forma de SeO_4^{2-}	5+5
	50 μM de selenio: 25 μM en forma de SeO_3^{2-} y 25 μM en forma de SeO_4^{2-}	25+25
	100 μM de selenio: 50 μM en forma de SeO_3^{2-} y 50 μM en forma de SeO_4^{2-}	50+50

3. 3. Preparación de la muestra para análisis

Previamente a la explicación de la preparativa de muestras se detallan las determinaciones que se llevan a cabo:

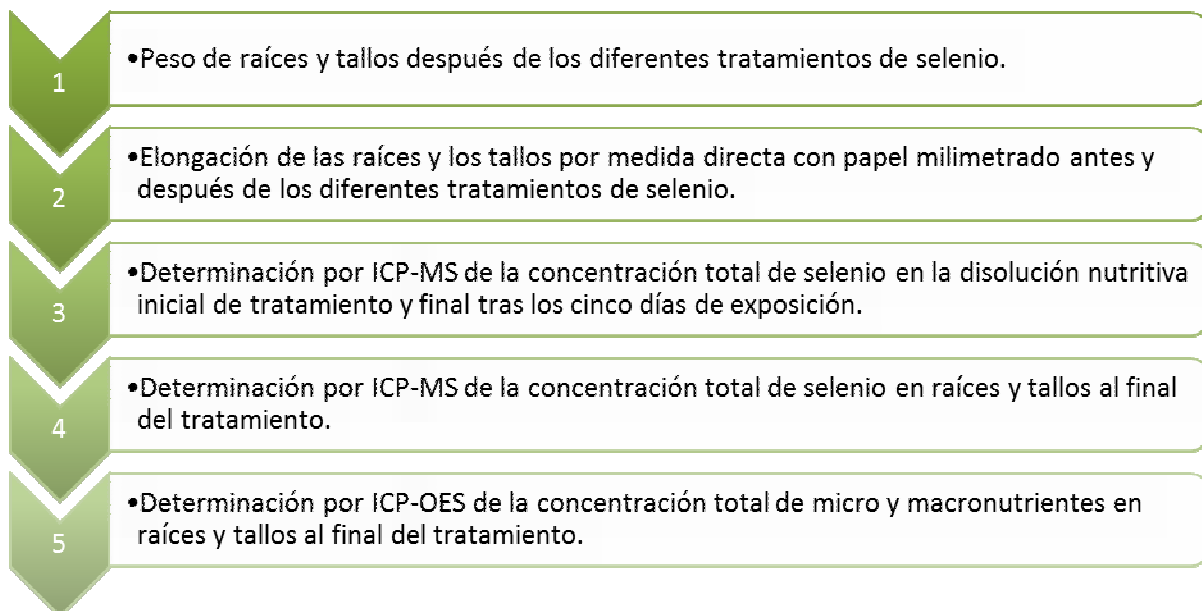


Figura 7. Determinaciones analíticas que se realizan después de cada cultivo hidropónico.

Para preparar las muestras para las distintas determinaciones que se han detallado anteriormente, tras los cinco días de incubación en el medio hidropónico enriquecido con selenio, las plantas se recolectan y las raíces se liberan de restos de la solución hidropónica por enjuague en una disolución de 10 mM CaCl_2 durante 5-10 minutos. Tras esta desorción, las raíces se limpian con agua destilada, se dividen por corte con bisturí las raíces de los tallos, se mide su longitud y se pesan y, finalmente, se congelan bajo nitrógeno líquido para mantener su integridad hasta la liofilización, después de la cual, las plantas se vuelven a pesar para determinar su contenido hídrico. Esta muestra liofilizada es la que se utiliza para la determinación de selenio total, micronutrientes y macronutrientes por ICP-MS e ICP-OES, respectivamente. Adicionalmente se toman las muestras acuosas de las disoluciones nutritivas antes y después del tratamiento con selenio para hacer el balance de masas total de cada tratamiento.

Las tres raíces y los tres tallos de las plantas de una misma cubeta de cultivo, se combinan para dar lugar a una única muestra de raíz y otra de tallo. La toma de muestra se hizo de esta manera para tener mayor cantidad de muestra. Al hacer crecer el trigo durante poco tiempo, las plantas presentan una baja masa al final del cultivo y analizar cada raíz y tallo por separado ocasiona problemas en la determinación de las bajas cantidades de los elementos analizados. En consecuencia, se asume que todas las plantas de una misma cubeta de cultivo se comportan de la misma manera y se homogenizan en conjunto. Por otro lado, para la estadística, se tienen replicados de cada cultivo en las distintas cubetas.

Cada parte de la planta (raíz y tallo) se digiere en microondas analítico equipado con vasos de digestión de PFA con 5 ml de HNO_3 70% (Instra Analysed, JTBaker, EEUU) y 5 ml de agua MilliQ. La disolución obtenida tras la digestión se filtra, se diluye adecuadamente con agua MilliQ y se analiza para determinar el contenido total de selenio por ICP-MS y de micronutrientes y macronutrientes por ICP-OES.

3. 4. Análisis de selenio total por ICP-MS

Para la determinación de selenio en el material vegetal del cultivo hidropónico digerido en el microondas analítico, se ha utilizado el ICP-MS, reconocido como uno de los instrumentos analíticos más sensibles para el análisis de trazas en muestras medioambientales y biológicas.

La solución de optimización sirve para la calibración de masas y para la optimización de las condiciones instrumentales tales como, por ejemplo, el ajuste de máxima sensibilidad con respecto a la mínima tasa de formación de óxidos y de iones de doble carga.

Cada vez que se procede a un análisis con el ICP-MS, el equipo se somete a un tiempo de estabilización del plasma de 15 min. Una vez estabilizado se optimizan diariamente los parámetros experimentales analizando una disolución multielemental de concentración conocida. Esta solución de optimización sirve para la calibración de masas y para la optimización de las condiciones instrumentales tales como, por ejemplo, el ajuste de máxima sensibilidad con respecto a la mínima tasa de formación de óxidos y de iones de doble carga. Para analizar el selenio, se comprueba que la señal de fondo sea mínima para la masa de los diferentes isótopos de selenio, haciendo pasar una disolución de 1 ppb de selenio. Los parámetros que se optimizan diariamente son los siguientes:

- Posición de la antorcha (horizontal, vertical y profundidad).
- Caudales de gas de refrigeración, auxiliar y nebulización.
- Voltajes de las lentes del sistema óptico.

Una vez el sistema está debidamente optimizado, se procede al análisis monitorizando los isótopos del elemento de interés (ver Tabla 5). Para corregir posibles efectos de matriz y de deriva instrumental, se utilizan patrones internos, en este caso Ga, Rh e In (los tres elementos con masas similares al selenio, consideradas masas intermedias). Tanto el blanco, como los patrones y las muestras tienen una concentración de 5 ppb de los patrones internos Ga, Rh e In. Se aplica un flujo de 3 ml min^{-1} de hidrógeno para presurizar la celda de colisión y poder así monitorizar los isótopos de selenio 80 y 82.³⁴

Tabla 5. Parámetros de adquisición de datos.

Isótopos de Se monitorizados	^{76}Se , ^{77}Se , ^{78}Se , ^{80}Se , ^{82}Se
Isótopos de patrones internos monitorizados	^{71}Ga , ^{103}Rh , ^{115}In
Tiempo de adquisición por punto	10 s
Replicados por punto	3

Para cada determinación se preparan patrones de selenio a partir de las correspondientes diluciones de la disolución patrón monoelemental de 1000 ppm de selenio (Sigma Aldrich, EEUU). En todas las determinaciones se trabaja mediante calibración *Matrix-*

matched para evitar efectos de matriz, para ello se procede de tal manera que la matriz del calibrado y la matriz de las muestras es la misma.

Para validar la metodología analítica, se construyen las rectas de calibrado y alternativamente se fortifican muestras con una concentración de selenio conocida antes y después de las digestiones. La recuperación del dopaje inicial de la muestra verificará la robustez del método. Adicionalmente, el análisis de blancos y patrones de concentración conocida intercalados a lo largo del análisis contribuyen a la validación del método analítico.

En ausencia de un material de referencia de trigo enriquecido con selenio, se utilizó como tal el CRM SELM-1 (Selenium Enriched Yeast Certified Reference Material, NRC, Canada), el cual se analizó para validar la metodología analítica en la determinación de selenio total mediante ICP-MS. El contenido analizado fue de $1980 \pm 41 \text{ mg kg}^{-1}$ (expresado como promedio \pm SD, $n=3$), resultado que está en concordancia con los valores determinados por el NRC durante la producción de este material ($2059 \pm 64 \text{ mg kg}^{-1}$).³⁵

3. 5. Análisis de la composición nutricional

Los residuos acuosos ácidos resultantes de la digestión de los tallos y las raíces del trigo, se analizan con ICP-OES para determinar la concentración de macronutrientes (Ca, K, Mg, P y S) y micronutrientes (Cu, Fe, Mn y Zn) para el estudio de los efectos de la adición de selenio en la absorción de los nutrientes en estudio. Estas determinaciones con ICP-OES han sido realizadas por el laboratorio de los Servicios Científicotécnicos de la Universidad de Barcelona. Para la calibración se utilizaron disoluciones de 1000 mg l^{-1} (High Purity Standards, USA) de los correspondientes nutrientes. Las longitudes de onda utilizadas para cada elemento se muestran en la

Tabla 6:

Tabla 6. Longitudes de onda de los elementos analizados por ICP-OES.

Elemento	Longitud de onda (nm)	Elemento	Longitud de onda (nm)
Ca	317,933	Fe	259,939
Mg	279,077	B	249,677
Mn	257,610	S	181,975
Zn	206,200	P	178,221
K	766,490	Cu	324,752

3. 6. Análisis de datos

El análisis estadístico de los datos se ha realizado por comparación de medias entre los distintos tratamientos mediante el t-test para dos muestras con un nivel de significación de 0,05 con el programa estadístico SPSS.³⁶ Todos los resultados ilustrados a continuación, se expresan como promedio de 4 replicados con sus correspondientes desviaciones estándar.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. 1. Efectos del selenio en el crecimiento y biomasa del trigo

Para evaluar el efecto del selenio en el crecimiento de la planta de trigo se han estudiado varios parámetros relacionados con las necesidades de un crecimiento fisiológico normal, como son los siguientes:

- Crecimiento en elongación de las raíces (Figura 8.a).
- Peso fresco del tallo y de la raíz (Figura 8.b y c).
- Absorción de solución nutritiva (Figura 8.d).

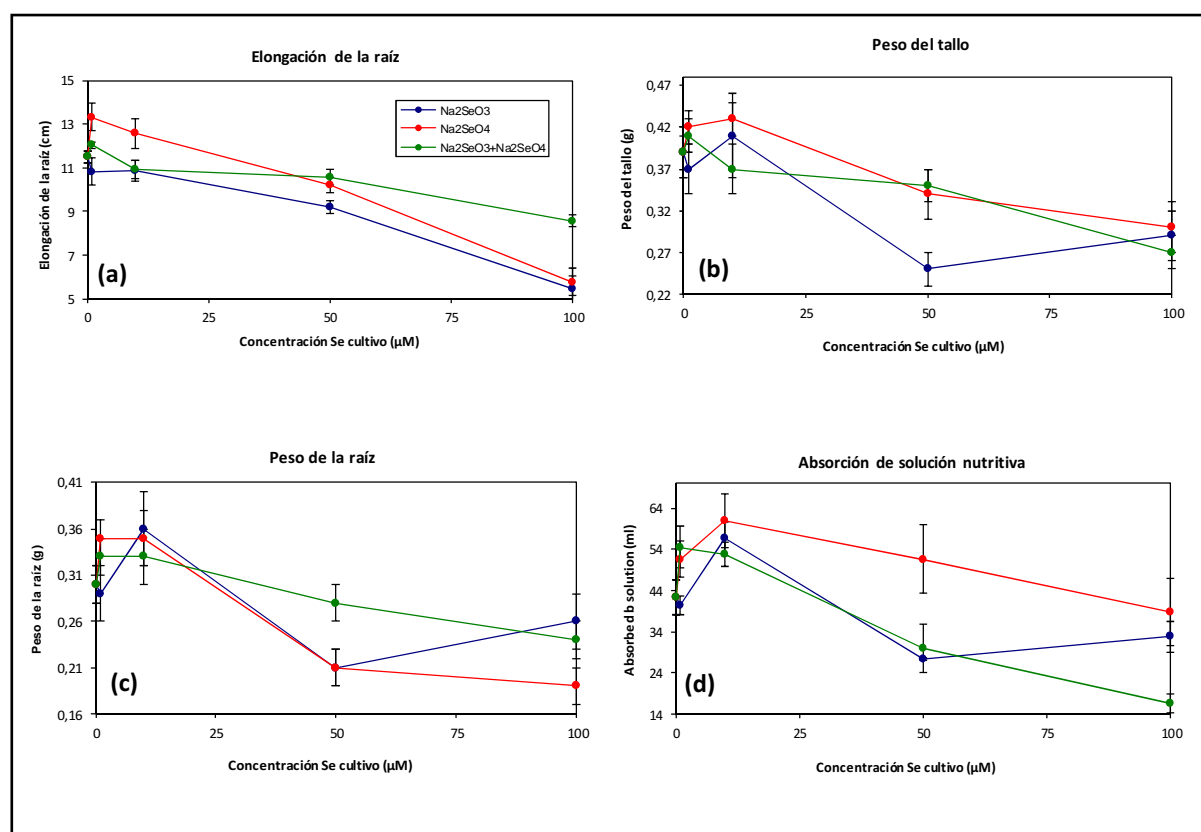


Figura 8. Efectos del selenito (línea azul), selenato (línea roja) y mezcla de ambas especies (línea verde) en los parámetros de crecimiento del trigo después de 5 días de exposición: elongación de la raíz (a), peso fresco del tallo (b), peso fresco de la raíz (c) y absorción de solución nutritiva (d). Los valores graficados son promedios \pm el error estándar (n=4).

El decrecimiento de las raíces que se observa en la Figura 8.a para concentraciones de enriquecimiento de selenio superiores a 10 μM , alcanza un mínimo de elongación en 100 μM y denota visibles síntomas de toxicidad, como un elevado marchitamiento y una fuerte

clorosis. Con estos resultados, se puede determinar que la concentración externa de selenio que inhibe en un 50% la elongación de la raíz (EC_{50}) es de 100 μM para los tratamientos individuales de selenito y selenato pero no para la mezcla de ambos en un mismo tratamiento, donde el decrecimiento no llega a ser tan elevado. La toxicidad observada puede ser debida a la interferencia de las especies de selenio en el proceso de generación de aminoácidos y en el proceso celular de producción de energía. La incorporación en las proteínas de las plantas de SeCys y SeMet en lugar de los aminoácidos análogos de azufre, cisteína (Cys) y metionina (Met) respectivamente, induce a efectos toxicológicos dado que las diferencias en el tamaño y las propiedades de ionización del S y el Se dan lugar a alteraciones significativas en las estructuras proteicas vegetales.^{37, 38} En el caso del tratamiento con selenato, enriquecimientos de hasta 10 μM causan una elongación ligeramente superior. Por el contrario, los tratamientos con selenito o con la mezcla de ambas especies en el mismo rango de concentraciones no muestran diferencias significativas en la variación de este parámetro al comparar con el cultivo de control.

En lo que se refiere a peso de tallo y raíz (Figura 8.b y c) tras los cinco días de exposición al selenio en las diferentes formas, en el rango de concentraciones de 0 a 10 μM no se observan diferencias significativas en el peso fresco de cada parte de la planta. En cambio, a partir de 10 μM el peso de ambas partes empieza a disminuir significativamente, resultado que se correlaciona con el decrecimiento de la elongación de las raíces mencionado anteriormente.

Por último, en la Figura 8.d, se puede observar que el volumen de solución nutritiva aumenta a concentraciones bajas de selenio mientras que empieza a disminuir cuando sobrepasamos concentraciones de 10 μM debido a una capacidad de absorción menor por parte de las raíces a estos niveles de concentración.

Los resultados expuestos confirman que hay una dualidad de los efectos del selenio que está definida por el nivel de concentración de selenio aplicado a la solución nutritiva y la forma química utilizada para el enriquecimiento. Dicha dualidad ha sido publicada previamente en otros trabajos, pero únicamente para enriquecimientos con cada una de las formas de selenio aplicadas individualmente, nunca mezclas de ambas especies.^{11,39,40,19}

Es importante destacar, que la presencia de las dos especies de selenio mezcladas en un mismo cultivo en la solución nutritiva a concentraciones elevadas (25+25 y 50+50) muestran una toxicidad menor que la del selenito individualmente al mismo nivel de

concentración (50 y 100 μM), lo cual conduce a la conclusión de que el selenato, puede atenuar la toxicidad del selenito en las mezclas de ambas especies.

4. 2. Concentración y distribución del selenio en las plantas de trigo

Para evaluar la distribución del selenio en las distintas partes del trigo se ha determinado la concentración total de este elemento en la raíz y en los tallos de cada enriquecimiento llevado a cabo. En la Figura 9, se muestra gráficamente la acumulación y distribución de selenio entre raíces y tallos del trigo para cada tratamiento. Para una mejor visualización de los resultados, la figura se divide en dos partes: una con los tratamientos del rango de concentraciones de 1 a 10 μM (Figura 9.a) y otra con el rango de 50 a 100 μM (Figura 9.b).

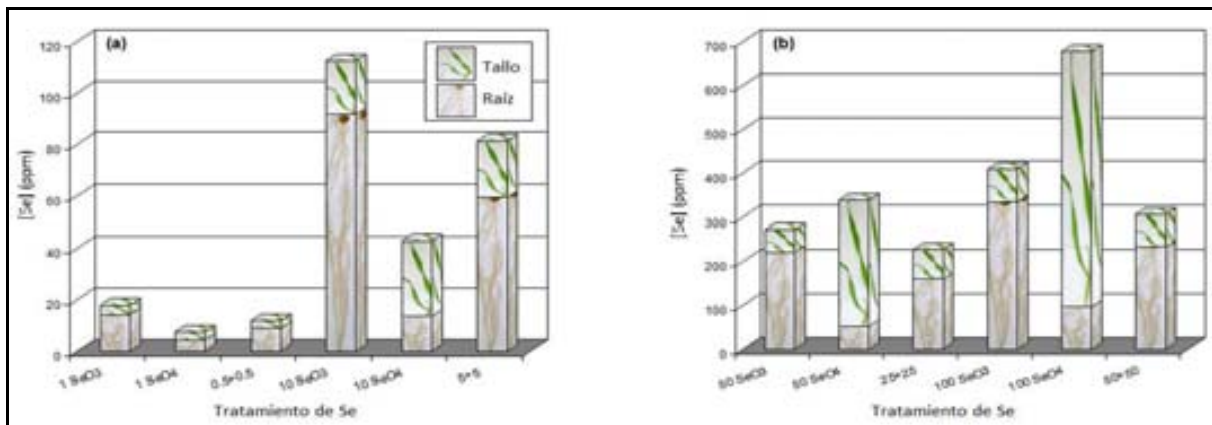


Figura 9. Concentración total en ppm y distribución de selenio en tallo y raíz para cada uno de los tratamientos de selenio.

Es de especial importancia destacar, que el porcentaje de distribución de selenio entre raíz y tallos se mantiene constante para cada tipo de enriquecimiento independientemente de los cambios de concentración de selenio. Por ejemplo, todos los enriquecimientos de selenito acumulan mucho más selenio en las raíces que en las hojas. Como se puede observar en la Figura 9, se percibe lo mismo para todos los tratamientos con selenato individualmente y para la mezcla de ambas especies.

Concretamente, para el selenito y la mezcla de ambas especies, el selenio se acumula principalmente en la raíz (80 % y 70 %, respectivamente). Por otro lado, para el caso del selenato, se observa que los niveles de selenio en el tallo, doblan los de la raíz para todos los niveles de concentración de selenio de los distintos tratamientos, excepto el “1 SeO4” donde

el selenio se distribuye igualmente entre tallo y raíz. La explicación a esta excepción podría ser que concentraciones bajas de selenio ($1 \mu\text{M}$) no supongan la cantidad de selenio necesaria para metabólicamente producirse la translocación de raíces a tallos en mayor medida, quedando distribuido el selenio igualmente entre tallo y raíz.

Por otra parte, se observa que en los tratamientos de 1 y $10 \mu\text{M}$ de selenato, donde esta especie estimula la elongación de la raíz, el selenio total acumulado en las plantas es mucho menor (unas 2,5 veces) que en el caso del selenito. Aunque, por el contrario, cuando se trabaja con concentraciones de selenato tóxicas (50 y $100 \mu\text{M Se}$) el selenio total que se acumula es superior al acumulado en los mismo tratamientos enriquecidos con selenito.

La capacidad del trigo para absorber y transportar selenio de la raíz al tallo depende de la forma química en que el selenio se administre y de la concentración del mismo en la solución nutritiva del cultivo. La elevada acumulación de selenio observada en las raíces en los tratamientos con selenato, comparada con el selenito también ha sido observada como resultado de otros trabajos.^{16,17,18,19} En los estudios referenciados se propone que la absorción de selenato compite con la de sulfato y es asimilado muy probablemente por la misma vía metabólica que el sulfato en los cloroplastos debido a su analogía química. Este hecho, provoca que se reemplace la cisteína y la metionina por los correspondientes selenoaminoácidos en las proteínas vegetales.

Las plantas no acumuladoras de selenio, es decir, que absorben selenio pero son incapaces de tolerar elevadas concentraciones en sus tejidos, presentan síntomas de toxicidad a concentraciones entre 10 y 100 ppm de selenio en peso seco, aunque el valor exacto depende especialmente de la relación selenato:sulfato en la rizosfera.²⁰ Estas plantas toleran bajas concentraciones de selenio en la rizosfera restringiendo la absorción de selenio y su transporte hacia el tallo.^{41,42} El trigo estudiado, no es acumulador de selenio pero, considerando lo expuesto hasta el momento y viendo los resultados obtenidos en nuestro estudio, se puede indicar que tiene una tolerancia relativamente alta en comparación con otras plantas no acumuladoras, ya que se ha observado que la toxicidad ocurre por encima de 100 ppm de selenio en peso seco del material vegetal analizado.

Considerando la concentración de selenio total en el conjunto de la planta, se observan dos comportamientos distintos: a bajas concentraciones de selenio (1 y $10 \mu\text{M}$) son los tratamientos con selenito los que acumulan mayor concentración de selenio, mientras que a niveles más altos (50 y $100 \mu\text{M}$) son los tratamientos con selenato.

Sorprendentemente, en el caso de los cultivos mixtos, la cantidad total de selenio en planta es menor que en los tratamientos con selenito, pero mayor que en los de selenato, para los niveles 1 y 10 μM de selenio en la solución nutritiva. En cambio, en los niveles de 50 y 100 μM , el selenio acumulado en el conjunto de la planta siempre es inferior al acumulado con las formas individuales. Estos resultados pueden ser consecuencia de una posible interacción entre el selenito y el selenato. Parece ser, que la absorción de selenito está favorecida frente a la de selenato en los cultivos mixtos ya que estos tienen un patrón de distribución entre tallo y raíz similar al del selenito aplicado individualmente, el cual tiende a acumularse mayormente en la raíz. Es muy probable que la presencia de selenito en el medio, bloquee el transporte del selenato hacia el tallo. Esta observación, juntamente con el hecho de que el selenito se acumula mayormente en las raíces, puede ser la explicación del paralelismo observado entre el selenito aplicado individualmente y los cultivos mixtos en términos de parámetros de crecimiento relacionados con las raíces (elongación de la raíz y su peso y volumen de solución nutritiva absorbida). En general, el transporte de selenio de la raíz al tallo está íntimamente relacionado con la forma química en la cual el selenio se aplica al cultivo.⁴³

La eficiencia de las plantas de trigo para transportar selenato a los tallos puede ser debida a dos mecanismos complementarios: una vía de protección de la planta contra la toxicidad del selenato, acumulándolo en las vacuolas de las hojas y, al mismo tiempo, una vía que facilita esta eliminación por la formación de especies de selenio volátiles. En nuestro estudio, no se ha observado volatilización de selenio (analizado mediante balance de masas), por este motivo, el primero de los mecanismos propuestos es el más probable y la detoxificación de selenato sea por compartimentalización en las vacuolas de las hojas. Este mecanismo, da lugar a una forma menos tóxica al tener menos movilidad y menos posibilidades de ser incorporado en proteínas vegetales.

En el caso del selenito, se ha observado que este tiende a acumularse en las raíces más que en los tallos como en los estudios de Hopper y Parker de 1999 y de Feng et al. en 2009.^{11,19} Únicamente un 20 % del selenio que proviene del selenito absorbido es transportado hacia los tallos, lo cual es comparable con la pequeña fracción de esta misma especie encontrada por Arvy en 1993 y el 10 % De Souza et al. en el 2000 en especies de dicotiledóneas.^{15,44} Esta distribución entre tallo y raíz tan desigual puede ser explicada por la transformación no enzimática del selenito a especies orgánicas de selenio tóxicas, que la

planta no transporta de las raíces a los tallos. Las formas orgánicas de selenio pueden entrar con facilidad en las vías de asimilación del sulfuro, dando lugar a una mayor presencia de selenio en proteínas.^{45,46}

El transporte de selenato es claramente más activo que el de selenito por su acumulación mayoritaria en los tallos, mientras que el selenito se acumula más en las raíces.⁴⁷ Hua-Fen Li, Steve P. McGrath and Fang-Jie Zhao también publican en 2008 que la absorción de selenito es menos activa y que pese a la similar velocidad de asimilación de selenito y selenato por el trigo, el selenito es transformado más rápidamente a formas orgánicas en las raíces que el selenato, siendo este último, el que tiene una mayor movilidad hacia los tallos como forma inorgánica.¹⁷ Dicha bibliografía, permite explicar nuestros resultados en cuanto a la distinta distribución del selenio en el trigo en función del enriquecimiento con cada una de las especies. Los resultados correspondientes a los cultivos mixtos de las dos especies, también concuerdan con esta interpretación de las especies individuales, dado que el selenio es mayormente acumulado en las raíces, lo cual podría ser debido a que el selenito frente el transporte de selenato de las raíces a los tallos.

Estas diferencias en la absorción de selenio y su transporte de la raíz a los tallos al variar la especie de selenio con la que se hace el cultivo, sugieren que la bioasimilación de cada especie de selenio sigue un mecanismo de distribución en la planta diferente. Dicho mecanismo podría estar relacionado con el coeficiente de difusión de cada especie ya que su dinámica en solución es distinta. Concretamente, el coeficiente de difusión del selenato es de hasta tres órdenes de magnitud superior al del selenito.⁴⁸ Esto implicaría que el período transiente del selenito en la raíz sea superior al del selenato, lo cual conllevaría a un mayor tiempo de contacto con las especies reactivas de las raíces, quedando mayoritariamente acumulado en esta parte de la planta. Por el contrario, el selenato, debido a su mayor capacidad de difusión, se transloca más rápidamente a los tallos.

4. 3. Efecto del selenio en la absorción de nutrientes

Se ha estudiado la concentración de algunos macronutrientes (Ca, K, Mg, P y S) y micronutrientes (Cu, Fe, Mn y Zn) en los tallos y raíces de las plantas tras los diferentes tratamientos de selenio para evaluar el efecto que tiene su presencia en la absorción y acumulación de nutrientes minerales esenciales. En las Figura 10 y Figura 11 se ilustran las

concentraciones de los macronutrientes y micronutrientes respectivamente en raíces y tallos para todos los cultivos excepto los mixtos, donde no se observaron diferencias significativas para la absorción de nutrientes. Para ver claramente las diferencias entre los cultivos a bajas concentraciones, los gráficos para cada uno de los nutrientes estudiados se ha dividido en dos rangos: uno de 0 a 10 μM y otro de 10 a 100 μM .

En términos generales se observa que la absorción de macronutrientes se ve menos afectada por la presencia de selenio que la de micronutrientes, lo cual es lógico si se tiene en cuenta el importante rol de los macronutrientes en la supervivencia de la planta. Los efectos de selenio en las raíces son diferentes de los observados en los tallos y aquellos elementos que se acumulan mayoritariamente en las raíces (Ca, Fe, Zn y Mn) son más sensibles a la presencia de selenio.

A continuación se presentan separadamente los resultados y la discusión de los efectos del selenio en la absorción de macronutrientes y micronutrientes.

4.3.1. Efectos en los macronutrientes

En primer lugar es importante destacar que el aumento o disminución de la concentración de los macronutrientes entre los distintos cultivos en ningún caso superó el 35 % (ver Figura 10), siendo el Ca y el S los más afectados por la presencia de selenio. Adicionalmente los resultados muestran que no hay redistribución de los elementos entre las raíces y los tallos para ningún macronutriente y que cuando se observa una disminución de la acumulación de un macronutriente en las raíces, no suele ir compensada por la acumulación en los tallos, excepto en el caso del azufre para las plantas expuestas a elevadas concentraciones de selenato.

Como se puede observar en la Figura 10.a, la absorción de calcio en las raíces se ve mucho más afectada por la exposición a bajas concentraciones de selenio que a niveles altos (50 y 100 μM), especialmente cuando se aplica como selenato. En el caso de los tallos, no se observan cambios significativos en la concentración de calcio.

En la Figura 10.b se muestra el efecto sobre la absorción de potasio. El selenito tiene un mayor efecto en la absorción de potasio que el selenato a bajas concentraciones (hasta 10 μM). Por el contrario, a niveles más altos de selenio, no se observan diferencias entre las dos formas de selenio aplicadas. En los tallos, la acumulación de potasio no se ve alterada significativamente por la adición de selenio en la solución nutritiva.

Los resultados del estudio de la absorción de magnesio se pueden ver en la Figura 10.c donde se observa que en las raíces, la absorción de este macronutriente se ve afectada de distinta manera en función de la forma de selenio aplicada. El enriquecimiento con selenito causa una disminución de los niveles de magnesio, manteniéndose constante a partir de 50 μM Se. Mientras, el selenato, hace disminuir la absorción de magnesio hasta un nivel de 10 μM . No obstante, a niveles más elevados, no se observan diferencias significativas. En los tallos, la acumulación de potasio no se ve alterada por la adición de selenio de forma significativa.

Tanto el selenito como el selenato, causan una disminución similar en la concentración de fósforo en las raíces en los cultivos con elevadas concentraciones de selenio (Figura 10.d). En los tallos, el nivel de fósforo aumenta con la aplicación de las dos formas de selenio estudiadas a niveles bajos, mientras que aumenta para los niveles altos, especialmente en el caso del selenato.

Finalmente, en la Figura 10.e se observa que la absorción de azufre por las raíces no depende de la especie de selenio aplicada, sino de la concentración total de selenio de la solución nutritiva. A concentraciones bajas de selenio (hasta 10 μM), la absorción de azufre es algo más elevada que en las raíces de las plantas control, mientras que a niveles elevados de selenio (50 y 100 μM), el contenido de azufre es inferior a los controles. En los tallos, todos los cultivos de selenito tienen una respuesta similar, pero en el caso del selenato, elevadas concentraciones de esta especie hacen aumentar significativamente la acumulación de azufre en los tallos, compensando el bajo contenido de azufre en las raíces, con valores totales de azufre (raíz y tallo) superiores a los de las plantas control.

La presencia de calcio es esencial para la pared celular vegetal y, conjuntamente con el potasio, son responsables de mantener la integridad de la membrana vegetal, así como una buena osmoregulación celular. Por lo tanto, un aumento de los niveles de calcio y magnesio con el aumento de la concentración de selenio (Figura 10a y c) pueden ser una vía para restablecer la integridad de la membrana de la raíz en defensa a la toxicidad severa de selenio.

El hecho de que los niveles de fósforo se vean más afectados por el selenato que por el selenito, que es la forma que tiene más similitud con el fosfato, sugiere que el selenito no está interfiriendo en la absorción de fósforo a bajas concentraciones. No obstante, a

elevados ratios Se:P hay un aumento en la competición metabólica de estos dos elementos que hacen decrecer el nivel de fósforo en los tejidos.

Nuestros resultados concuerdan con los de Wu y Huang de 1992 donde la concentración de calcio aumentó, pero la de fósforo disminuyó bajo estrés de selenio y con los de Hopper y Parker de 1999, que observaron una inhibición de la absorción de fósforo por el selenio en *Lolium perenne* y *Trifolium fragiferrum*.^{42,11}

El elevado transporte de azufre hacia los tallos en los cultivos de concentraciones de selenato elevadas (Figura 10.e), también se observó en los estudios de Bell.⁴⁹ En un estudio comparativo llevado a cabo por estos autores sobre el antagonismo entre el selenato y el sulfato, se llegó a la conclusión de que las plantas acumuladoras de selenio, absorben preferentemente el selenio (en forma de selenato) sobre el sulfato, pero en no acumuladoras la discriminación es contra el selenato. La fitotoxicidad provocada por elevados niveles de selenio, está asociada al reemplazo de los aminoácidos que contienen azufre por los análogos selenoaminoácidos.⁵⁰

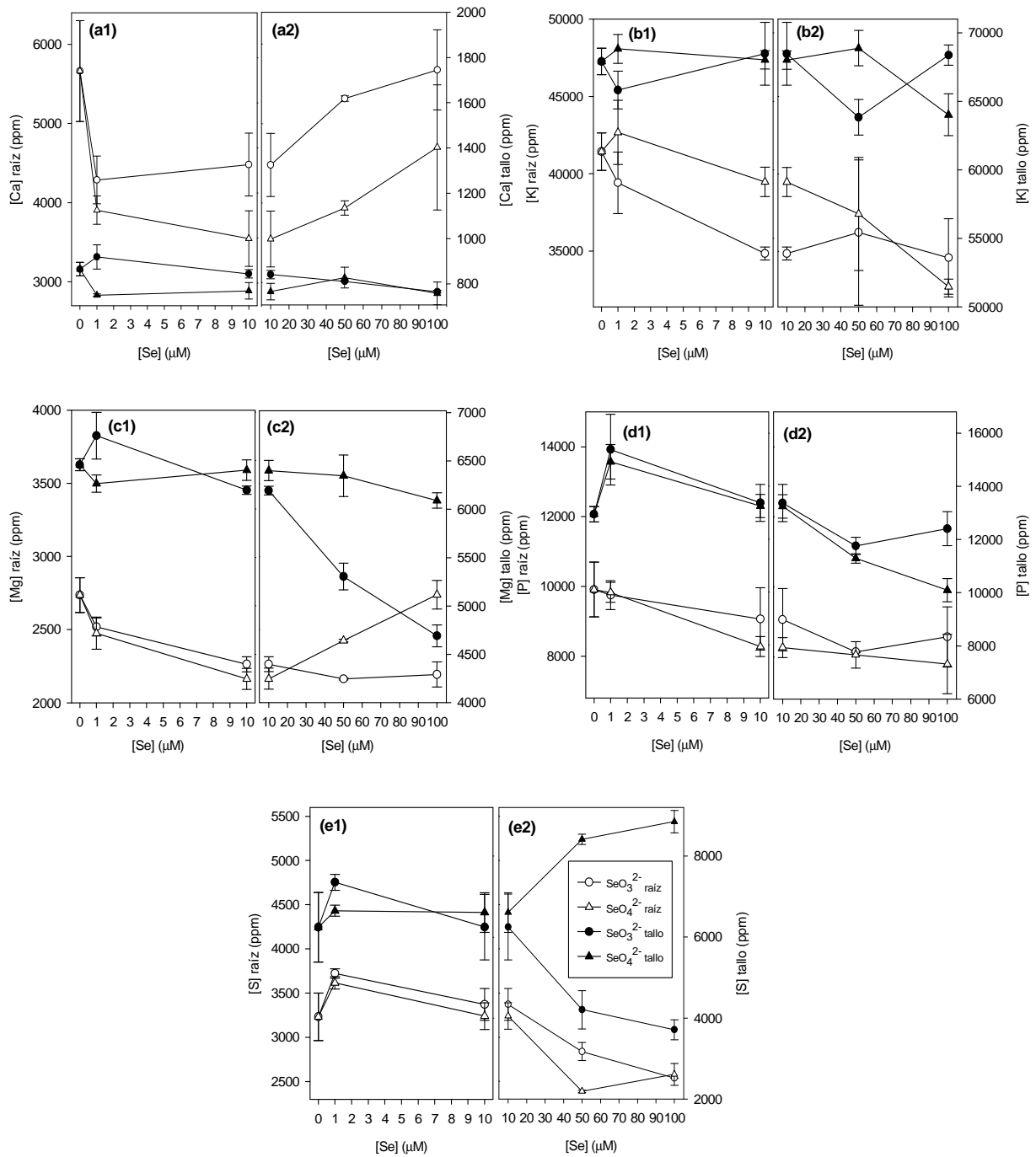


Figura 10. Concentración de macronutrientes en raíces (símbolos abiertos) y raíces (símbolos cerrados) tras 5 días de exposición a selenio en forma de selenito (SeO_3^{2-} , círculos) o selenato (SeO_4^{2-} , triángulos).

4.3.2. Efectos en los micronutrientes

Elevados niveles de selenato estimulan la absorción en las raíces de los micronutrientes, tales como cobre y manganeso en un 12-24 % y 30-35 %, respectivamente (Figura 11.a y c). Por el contrario, en los tallos no se observa un efecto en la acumulación de cobre, pero si hay una reducción del nivel de manganeso de un 20 %. En lo que al selenito se refiere, elevados niveles de esta especie de selenio (>10 μM), inhiben la absorción de cobre y manganeso tanto en las raíces como en los tallos, causando un gran impacto en los niveles de manganeso, donde se observa una disminución drástica de hasta un 50 % de este micronutriente.

Como se puede observar en la Figura 11.b, el efecto de la adición de selenio en la absorción de hierro y su acumulación en raíces y tallos es mayor cuando se aplica como selenato que como selenito. En las raíces, una concentración de selenio como selenato de 10 μM causa una reducción de la absorción de hierro de aproximadamente el 50 %. Dicha reducción, se compensa a elevadas concentraciones de selenio en la solución nutritiva, alcanzándose de nuevo los niveles de hierro de las plantas control. Por otra parte, en los tallos, no se observan diferencias significativas en la absorción de este micronutriente.

La absorción de zinc en las raíces no presenta variaciones hasta que no se alcanzan niveles de selenio en la solución nutritiva superiores a 50 μM , causando las dos especies de selenio el mismo efecto. El comportamiento en los tallos es diferente: la concentración de zinc absorbida que llega a los tallos disminuye ligeramente cuando se aplica selenito a bajas concentraciones si se compara con las plantas control (Figura 11.d).

Aunque tanto el cobre como el manganeso son elementos traza esenciales para el desarrollo y el crecimiento de la planta, estos son tóxicos cuando se encuentran en exceso.⁵¹ Muchos metales pesados estimulan la formación de radicales libres que favorecen el estrés oxidativo por transferencia electrónica directa (elementos Fenton) o por inhibición de reacciones metabólicas normales.^{52,53}

La absorción de micronutrientes se ve mucho más afectada por la presencia de selenio que la de macronutrientes. La acumulación de hierro muestra un comportamiento diferencial, probablemente debido a su elevada concentración en la planta en comparación con otros micronutrientes. Tanto en raíces como en tallos, todos los tratamientos de selenato causan una reducción de la absorción de hierro. Se observó clorosis en las plantas expuestas a niveles de selenio tóxicos que podría ser consecuencia de la fuerte interacción

del selenio con la absorción de los micronutrientes hierro, manganeso y cobre. Molnárová y Fargasová observaron en sus estudios una reducción de los pigmentos fotosintéticos severa cuando el trigo se encuentra expuesto a estrés de selenio, lo que podía estar relacionado con los bajos niveles de hierro en los tallos.⁵⁴

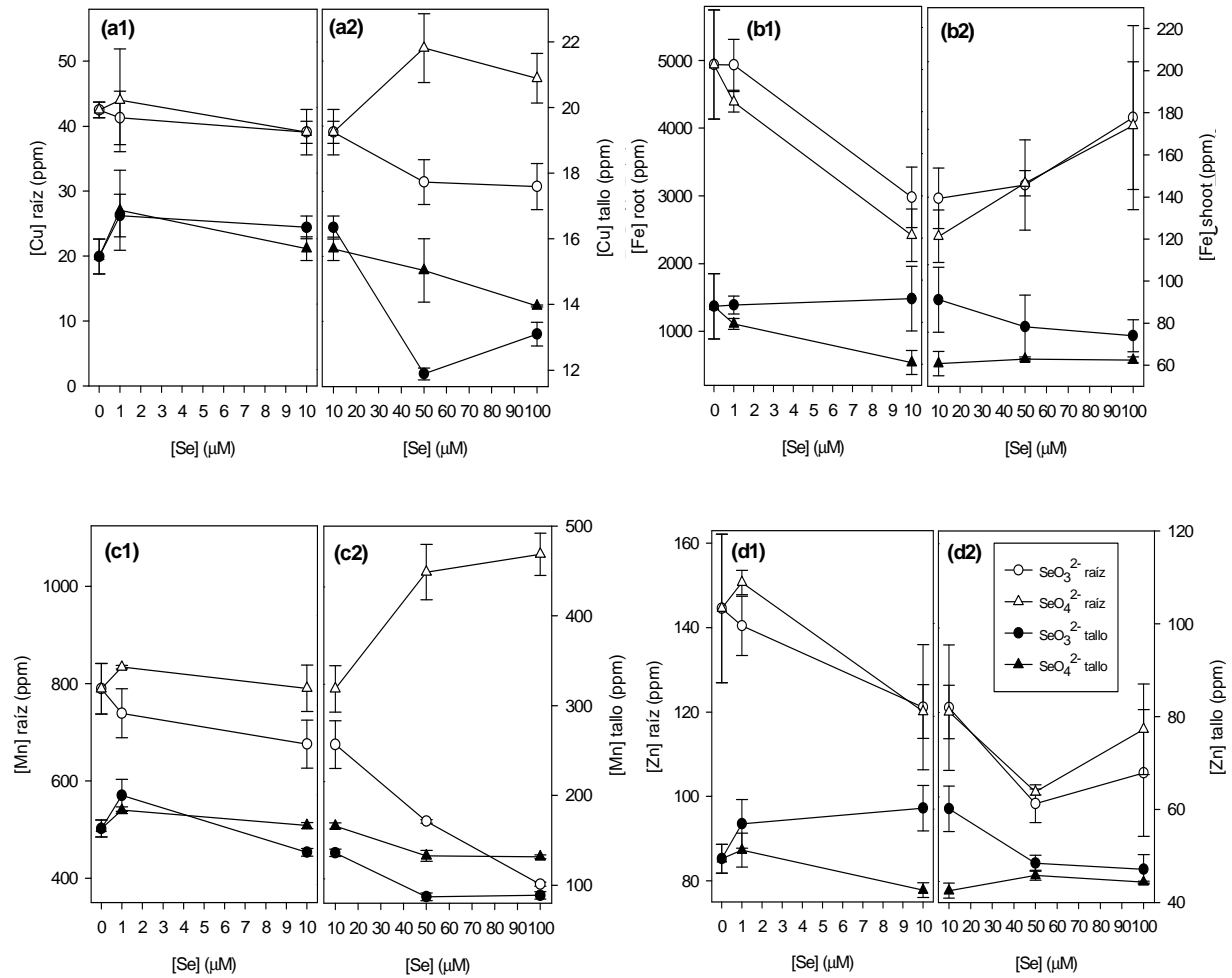


Figura 11. Concentración de micronutrientes en raíces (símbolos abiertos) y tallos (símbolos cerrados) tras 5 días de exposición a selenio en forma de selenito (SeO₃²⁻, círculos) o selenato (SeO₄²⁻, triángulos).

5. CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este capítulo nos han llevado a la conclusión de que el efecto del selenio en el desarrollo del crecimiento del trigo en cultivos hidropónicos depende de dos factores principales: la forma de selenio con las que se enriquece el cultivo (selenito, selenato o ambas en cultivo mixto) y la cantidad total de selenio en el medio de cultivo.

En lo que a la toxicidad se refiere, se ha observado que a elevadas concentraciones, el selenito perjudica más el desarrollo del trigo que el selenato y que, en combinación con el selenato, disminuye su toxicidad, probablemente por una atenuación de la misma provocada por la presencia de selenato.

En el presente trabajo, se ha visto que la presencia de selenio no afecta tan significativamente a la absorción de macronutrientes como a la de micronutrientes, especialmente los acumulados en las raíces, sin observarse un comportamiento común para todos los elementos estudiados.

Finalmente, nuestros resultados muestran que la presencia en el cultivo hidropónico de las dos formas de selenio combinadas, tienen un efecto similar al expuesto por la presencia de selenito individualmente. Este hecho sugiere, que la presencia de selenito bloquea la absorción y el transporte del selenato a lo largo de la planta. La presencia de las dos formas combinadas, puede reducir la elevada toxicidad que se atribuye al selenato por ser la forma más biodisponible en los suelos. Para explicar más detalladamente el mecanismo de absorción de selenio y su distribución en la planta, se requieren estudios de especiación que se mostrarán en el capítulo 3 y que se han llevado a cabo mediante técnicas de radiación sincrotrón.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Benton J (1982) Hydroponics: Its history and use in plant nutrition studies. *J Plant Nutr* 5 (8):1003-1030.
2. Jensen MH, Collins WL (1985) Hydroponic Vegetable Production, in *Horticultural Reviews*, Volume 7 (ed J. Janick), John Wiley & Sons, Inc., USA.
3. Le Bot J, Adamowicz S, Robin P (1998) Modelling plant nutrition of horticultural crops: a review. *Sci Hortic* 74:47-82.
4. Jensen MH (1999) Hydroponics Worldwide. *Acta Hort (ISHS)* 481:719-730.
5. Stavis B (1991) Market Reforms and Changes in Crop Productivity: Insights from China. *Pac Aff* 64(3):373-383.
6. Syltie PW, Dahnke WC (1983) Mineral and protein content, test weight, and yield variations of hard red spring wheat grain as influenced by fertilization and cultivar. *Plant Food Hum Nutr* 32(1):37-49.
7. Toor RK, Savage GP, Lister CE (2006) Seasonal variations in the antioxidant composition of greenhouse grown tomatoes. *J Food Compos Anal* 19(1):1-10.
8. Mercadante AZ, Rodriguez-Amaya DB (1991) Carotenoid composition of a leafy vegetable in relation to some agricultural variables. *J Agric Food Chem* 39:1094-1097.
9. Raffo A, La Malfa G, Fogliano V, Maiani G, Quaglia G (2006) Seasonal variations in antioxidant components of cherry tomatoes (*Lycopersicon esculentum* cv. Naomi F1) *J Food Compos Anal* 19(1):11-19.
10. Bugbee B, Salisbury FB (1985) An evaluation of MES [2(N-morpholino)-ethanesulfonic acid] and amberlite IRC-50 as pH buffers for nutrient solution studies. *J Plant Nutr* 8:567-583.
11. Hopper JL, Parker DR (1999) Plant availability of selenite and selenate as influenced by the competing ions phosphate and sulphate. *Plant Soil* 210:199-207.
12. Asher CJ, Edwards DG (1983) Modern solution culture techniques, in: Lauchli A, Bielecki RL (Eds.), *Encyclopedia of Plant Physiol*, New Series 15A, Springer-Verlag, Berlin.
13. Ulrich JM, Shrift A (1968) Selenium absorption by excised *Astragalus* roots. *Plant Physiol* 43:14-20.
14. Broyer TC, Johnson CM, Huston RP (1972) Selenium and Nutrition of *Astragalus*. II. Ionic sorption interactions among selenium, phosphate, and macronutrient and micronutrient cations. *Plant Soil* 36:635-649.
15. Arvy MP (1993) Selenate and selenite uptake and translocation in bean plants (*Phaseolus vulgaris*). *J Exp Bot* 44:1083-1087.
16. Ellis DR, Salt DE (2003) Plants, selenium and human health. *Curr Opin Plant Biol* 6:273-279.
17. Li HF, McGrath SP, Zhao FJ (2008) Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite, *New Phytol* 178(1):92-102.
18. Govasmark E, Singh BR, MacLeod JA, Grimmett MG (2008) Selenium concentration in spring wheat and leaching water as influenced by application times of selenium and nitrogen. *J Plant Nutr* 31:193-203.
19. Feng RW, Wei CY, Tu SX, Wu FC (2009) Effects of Se on the uptake of essential elements in *Pteris vittata* L. *Plant Soil* 325:123-132.
20. White PJ, Bowen HC, Parmaguru P, Fritz M, Spracklen WP, Spiby 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*. *J Exp Bot* 55:1927-1937.
21. Masscheleyn PH, Delaune RD, Patrick WH Jr (1990) Transformations of selenium as affected by sediment oxidation-reduction potential and pH. *Environ Sci Technol* 24:91-96.
22. Arvy MP, Thiersault M, Doireau P (1995) Relationship between selenium, micronutrients, carbohydrates, and alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* cells. *J Plant Nutr* 18:1535-1546.

23. Fargašová A, Pastierová J, Svetková K (2006) Effect of Se-metal pair combinations (Cd, Zn, Cu, Pb) on photosynthetic pigments production and metal accumulation in *Sinapis alba* L. seedlings. *Plant Soil Environ* 52:8-15.
24. Govasmark E, Grimmett MG (2007) A method for determination of selenium in organic tissues using microwave digestion and liquid chromatography. *J AOAC Int* 90:838-843.
25. Pérez G (2005) Disponibilidad de metales tóxicos en sitios contaminados. Tesis doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona.
26. Cela R (2002) Técnicas de separación en química analítica, Síntesis, Madrid.
27. Kebbekus BB, Mitra S (1998) *Environmental chemical analysis*, Chapman & Hall/CRC, Florida.
28. Huerta VD, Reyes LH, Marchante-Gayon JM, Sanchez MLF, Sanz-Medel A (2003) Total determination and quantitative speciation analysis of selenium in yeast and wheat flour by isotope dilution analysis. *J Anal At Spectrom* 18:1243-1247.
29. Montes-Bayón M, Molet MJD, Gonzalez EB, Sanz-Medel A (2006) Evaluation of different sample extraction strategies for selenium determination in selenium-enriched plants (*Allium sativum* and *Brassica juncea*) and Se speciation by HPLC-ICP-MS. *Talanta* 68(4):1287-1293.
30. Wilburn RT, Vonderheide AP, Soman RS, Caruso JA (2004) Speciation of selenium in the mushroom *Boletus edulis* by high-performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma-mass spectrometry with a collision cell. *Appl Spectrosc* 58:1251-1255.
31. Skoog DA, Leary JJ (2000) *Principios de Análisis Instrumental*, Ed. McGraw-Hill (5ª edición), Madrid.
32. Edbon L, Evans EH, Fisher A, Hill SJ (1998) *An Introduction to Analytical Atomic Spectroscopy*, John Wiley & Sons, New York.
33. Boumans PWJM (1987) *Inductively Coupled Plasma Emission Spectroscopy Part 1*, PWJM Boumans (Ed), John Wiley & Sons, New York.
34. B'Hymer C, Caruso JA (2006) Selenium speciation analysis using inductively coupled plasma-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1114:1-20.
35. Mester Z, Willie S, Yang L, Sturgeon R, Caruso JA, Fernandez ML, Fodor P, Goldschmidt RJ, Goenaga-Infante H, Lobinski R, Maxwell P, McSheehy S, Polatajko A, Sadi BBM, Sanz-Medel A, Scriver C, Szpunar J, Wahlen R, Wolf W (2006) Certification of a new selenized yeast reference material (SELM-1) for methionine, selenomethionine and total selenium content and its use in an intercomparison exercise for quantifying these analytes. *Anal Bioanal Chem* 385:168-180.
36. SPSS Inc. SPSS computer package (Version 14.0), Chicago, EEUU [Software].
37. Brown TA, Shrift A (1982) Selenium: toxicity and tolerance in higher plants. *Biol Rev* 57:59-84.
38. Eustice DC, Kull FJ, Shrift A (1981) Selenium toxicity: aminoacylation and peptide bond formation with selenomethionine. *Plant Physiol* 67:1054-1058.
39. Hartikainen H, Xue TL, Piironen V (2000) Selenium as an anti-oxidant and pro-oxidant in ryegrass. *Plant Soil* 225:193-200.
40. Cartes P, Gianfreda L, Mora ML (2005) Uptake of selenium and its antioxidant activity in ryegrass when applied as selenate and selenite forms. *Plant Soil* 276:359-367.
41. Wu XF, Lag J (1988) Selenium in Norwegian farmland soils. *Acta Agric Scand* 38(3):271-276.
42. Wu L, Huang ZZ (1992) Selenium assimilation and nutrient element uptake in white clover and tall fescue under the influence of sulfate concentration and selenium tolerance of the plants. *J Exp Bot* 43:549-555.
43. Zayed A, Lytle CM, Terry N (1998) Accumulation and volatilization of different chemical species of selenium by plants. *Planta* 206:284-292.

44. De Souza MP, Pilon-Smits EAH, Terry (2000) The physiology and biochemistry of selenium volatilization by plants. In: *Phytoremediation of toxic metals: Using plants to clean up the environment*, Raskin I and Ensley BD (eds), Wiley-Interscience Publication, New York.
45. Smith GS, Watkinson JH (1984) Selenium toxicity in perennial ryegrass and white clover. *New Phytol* 97:557-564.
46. De Souza MP, Pilon-Smits EAH, Lytle CM, Hwang S, Tai J, Honma TSU, Yeh L, Terry N (1998) Rate-limiting steps in selenium assimilation and volatilization by Indian mustard. *Plant Physiol* 117:1487-1494.
47. Xiao-Zhang Yu, Ji-Dong Gu (2008) Differences in uptake and translocation of selenate and selenite by the weeping willow and hybrid willow. *Environ Sci Pollut Res* 15:499–508.
48. Alrichs JS, Hossner LR (1989) Self-diffusion of selenate and selenite in overburden. *J Environ Qual* 18:479-482.
49. Bell PF, Parker DR, Page AL (1992) Contrasting selenate sulfate interactions in selenium-accumulating and non accumulating plant-species. *Soil Sci Soc Am J* 56(6):1818-1824.
50. Terry N, Zayed AM, de Souza MP, Tarun AS (2000) Selenium in Higher Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51:401-432.
51. Pittman JK (2005) Managing the manganese: molecular mechanisms of manganese transport and homeostasis. *New Phytol* 167:733-742.
52. Hall, JL (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot* 53, 1-11.
53. Metwally A, Safronova VI, Belimov AA, Dietz KJ (2005) Genotypic variation of the response to cadmium toxicity in *Pisum sativum*. *J Exp Bot* 56:167-178.
54. Molnárová M, Fargasová A (2009) Se (IV) phytotoxicity for monocotyledonae cereals (*Hordeum vulgare* L., *Triticum aestivum* L.) and dicotyledonae crops (*Sinapis alba* L., *Brassica napus* L.). *J Hazard Mater* 172:854-861.

CAPÍTULO 2

Estudio del efecto del selenio en la absorción de mercurio en trigo

1. INTRODUCCIÓN	51
1. 1. El mercurio (Hg)	51
1. 2. La interacción entre el selenio y el mercurio	52
1. 3. Estudio hidropónico de la toxicidad del mercurio en trigo	53
1. 4. Técnicas analíticas.....	54
2. OBJETIVOS	57
3. EXPERIMENTAL	58
3. 1. Material vegetal y condiciones de cultivo.....	58
3. 2. Tratamientos con mercurio	59
3. 3. Tratamientos con mercurio y selenio	59
3. 4. Tinción vital.....	60
3. 5. Análisis de selenio y mercurio total por ICP-MS	61
3. 6. Análisis de la composición nutricional	62
3. 7. Análisis de datos	62
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
4. 1. Efectos del mercurio en los parámetros fisiológicos del trigo	63
4. 2. Efectos de la presencia simultánea de selenio y mercurio sobre los parámetros fisiológicos del trigo	66
4. 3. Efectos del selenio en la absorción de mercurio	70
4. 4. Efectos del mercurio en la absorción de selenio	72
4. 5. Efectos del selenio y el mercurio en la absorción de nutrientes esenciales	74
4.5.1. Efectos en los macronutrientes	76
4.5.2. Efectos en los micronutrientes	78
5. CONCLUSIONES.....	81
6. BIBLIOGRAFÍA	82

1. INTRODUCCIÓN

1. 1. El mercurio (Hg)

El aumento de la acumulación de mercurio en el medio ambiente amenaza los ecosistemas y, en consecuencia, el peligro de que aumente la exposición humana a este elemento. El mercurio se libera continuamente en la naturaleza proveniente de depósitos atmosféricos, erosión de los suelos y, principalmente, de la actividad antropogénica que engloba la minería, productos empleados en agricultura y residuos urbanos e industriales.¹ Es especialmente, la presencia del mercurio en los campos de cultivo, lo que ha alertado al consumo humano de los productos que derivan de las actividades relacionadas con la agricultura. Es bien conocido que la ingesta de bajas concentraciones de mercurio en períodos largos de tiempo, da lugar a disfunciones en órganos vitales y puede causar toxicidad crónica.² La preocupación de la comunidad científica y la repercusión que esto supone para la sociedad en lo que a toxicidad de mercurio se refiere, queda reflejada en las numerosas publicaciones sobre la presencia de este elemento en productos comestibles como plantas,³ vegetales,⁴ frutas,⁵ pescado⁶ y lácteos.⁷

El mercurio no suele encontrarse en la naturaleza como elemento puro, el metal líquido, pero sí se encuentra en los estados de oxidación I y II en forma de sales y compuestos inorgánicos. Los compuestos de mercurio más abundantes en el medio ambiente son las especies inorgánicas de Hg(II): HgS, HgCl₂, HgO y Hg(OH)₂. Es por este motivo, su abundancia en la naturaleza, que para evaluar la toxicidad del mercurio en el trigo se ha escogido como sal portadora de iones Hg (II) el cloruro de mercurio (II) (HgCl₂).

La fitoremediación es una tecnología emergente que utiliza las plantas para remediar suelos y aguas contaminados. Esta técnica ambiental es ecológica, efectiva, no intrusiva y de bajo coste en comparación con las metodologías convencionales de remediación de suelos basados en métodos bioquímicos o mecánicos.^{8,9,10} Concretamente, es de especial interés destacar la modificación genética de las plantas para la remediación de mercurio. Un ejemplo es la descontaminación de mercurio en suelos debida a la expresión de los genes bacterianos *mer*

B y *mer A* que capacitan a las plantas para convertir el $-\text{CH}_n\text{Hg}$ en Hg^{2+} y éste en Hg^0 que se volatiliza, respectivamente.^{11,12} En este sentido, es obvia la desventaja de este tipo de métodos, la falta de control sobre el destino final del mercurio y la consecuente contaminación atmosférica que provocan. Es por ello, que aumenta la necesidad de estudiar vías alternativas para hacer más efectiva la fitoremediación.

1. 2. La interacción entre el selenio y el mercurio

El selenio y el mercurio han sido considerados contaminantes medioambientales durante mucho tiempo, aunque el selenio también es considerado un elemento esencial para los seres humanos y la nutrición animal. El antagonismo entre estos dos elementos se presenta como uno de los ejemplos más importantes de interacción para la protección toxicológica. El efecto protector del selenio ante la toxicidad por mercurio y viceversa, ha sido observado en varios organismos vivos.¹³

El primer estudio sobre el efecto protector del selenio ante la toxicidad de mercurio, lo llevaron a cabo Parizek y Ostadalova en 1967 utilizando ratas de laboratorio.¹⁴ Mostraron que bajo la presencia de selenito de sodio, los riñones de las ratas no se veían afectados por la acción tóxica del cloruro de mercurio. Estos resultados llevaron a la comunidad científica a estudiar la interacción entre estos dos elementos en otros organismos y sistemas biológicos: bacterias,^{15,16} peces,^{17,18} aves^{19,20} y mamíferos.^{21,22} Una de las contribuciones más importantes en los estudios de la interacción entre el selenio y el mercurio a nivel biológico fue la aportada por Yoneda y Suzuki, los cuales descubrieron una interacción a nivel molecular entre la proteína del plasma humano selenoproteína P y el mercurio.²³

Así como los estudios en animales datan de 1967, los estudios en plantas son mucho más recientes, y no ha sido hasta el año 1996, que se ha publicado el primer trabajo²⁴ donde se estudia la interacción de estos dos elementos y el impacto del selenio en la absorción de mercurio en plantas, concretamente en rábanos (*Raphanus sativus*). En el mencionado estudio, observaron que la presencia de selenito y selenato en el medio de cultivo disminuía significativamente la absorción de mercurio en la planta. Otros estudios que han investigado la

interacción a nivel molecular entre el selenio y el mercurio en plantas se realizaron en planta de mostaza (*Brassica juncea*) y en soja (*Glycine max*), en 2006 y 2007, respectivamente.^{25,26}

Todos estos estudios llevan a concluir que el antagonismo entre el selenio y el mercurio, puede emplearse en métodos alternativos de fitoremediación, ya que su presencia, parece disminuir la absorción de mercurio por parte de la planta sin alterar la especiación del mercurio y evitando la transformación en una especie potencialmente más tóxica que la ya presente en los suelos, lo cual sucedía en el método de modificación genética mencionado anteriormente.

1. 3. Estudio hidropónico de la toxicidad del mercurio en trigo

Conocer como responde nuestra planta en estudio, el trigo, al estrés y toxicidad por mercurio es de vital importancia antes de proceder al estudio del efecto interactivo del selenio en la absorción del mercurio y definir su potencial uso en procesos de fitoremediación. Así pues, previamente al estudio de absorción de mercurio en presencia de selenio, hay que realizar un estudio de la toxicidad del mercurio, siendo este, el único elemento presente en el medio hidropónico. Por este motivo se realizó un cultivo hidropónico de trigo con distintas concentraciones de mercurio con el objetivo de determinar cual es la concentración EC_{50} de mercurio, es decir, aquella concentración que disminuye en un 50 % la elongación de las raíces de la planta con respecto a una planta control que no ha sido sometida a estrés por el elemento contaminante. Bajo dicha concentración, se procederá a los estudios en presencia de selenio para tratar de observar efectos de mejora en la respuesta del trigo al estrés por mercurio.

La elección del rango de concentraciones de mercurio se ha basado en la bibliografía más reciente sobre estudios similares en plantas cultivadas hidropónicamente (ver Tabla 1).^{27,28,29,30,31} En dos de las cinco publicaciones citadas, la máxima concentración de mercurio a que las plantas fueron sometidas fue 100 μM , observándose efectos extremadamente drásticos de toxicidad en las plantas estudiadas (planta de mostaza y arbustos mediterráneos). Es por este motivo, que para el presente estudio, se decide tomar como concentración máxima 50 μM y una mínima de 1 μM , cubriendo el siguiente rango para la determinación de la concentración EC_{50} : 1, 2, 5, 10,20 y 50 μM Hg.

Tabla 1. Rangos de concentración de Hg a que se someten distintas plantas según la bibliografía.

Planta	[Hg] mínima (μM)	[Hg] máxima (μM)	Referencia
Mostaza	5	100	25
Arbustos mediterráneos	0,5	100	26
Plantas terrestres (guisantes, trigo, remolacha, colza, trébol y sauce)	[Hg] de trabajo constante: $1 \mu\text{M}$		27
Alfalfa	0,3	30	28
<i>Medicago sativa</i>	1	40	29

1. 4. Técnicas analíticas

Las técnicas analíticas empleadas en el desarrollo experimental del presente estudio son las ya descritas en el capítulo anterior: microondas analítico para la digestión ácida de las muestras vegetales, ICP-MS para el análisis cuantitativo de selenio y ICP-OES para el análisis de micro y macronutrientes. A estas tres técnicas se añade la tinción vital, una técnica basada en la microscopía de fluorescencia para la determinación del grado en que están dañadas las membranas celulares vegetales, dada la presencia de ión mercurio, potencialmente tóxico, en el cultivo hidropónico que contempla el presente estudio. Este método se ha aplicado siguiendo lo descrito por Koyama et al. en 1995³² y Suzuki et al. en 1999³³, observando la viabilidad de las puntas de las raíces de las plantas en estudio mediante una doble tinción con yoduro de propidio (YP) y diacetato de fluoresceína (DAF).

El DAF es un éster no polar que puede permear a través de las membranas de las células vivas y ser hidrolizado por esterasas en el interior celular produciéndose fluoresceína. Dicho compuesto, al ser excitado por luz de 490 nm de longitud de onda, emite radiación fluorescente de color verde. La reacción se muestra en la Figura 1.

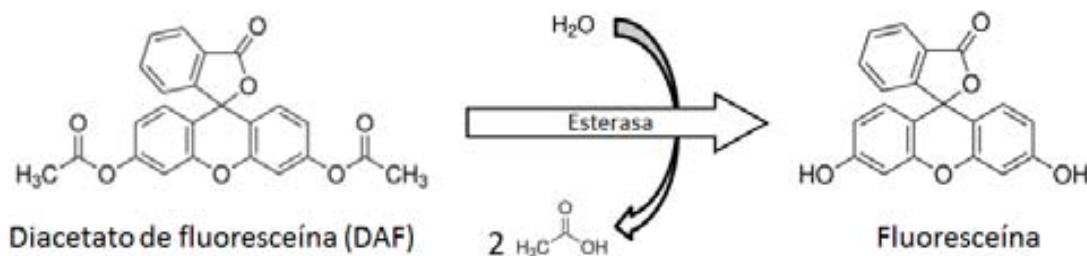


Figura 1. Reacción de hidrólisis del DAF por esterasa.

Por el contrario, las membranas celulares son impermeables al YP, un compuesto que sólo penetra en las células que tienen alterada la semipermeabilidad de la membrana por presentar daños en la misma. El YP, tras penetrar en las membranas reacciona con los ácidos nucleicos del interior, formando un complejo que emite fluorescencia de color rojo al ser excitado por una luz de 490 nm de longitud de onda. Dicha fluorescencia es más intensa que la producida por la fluoresceína, lo cual nos permite diferenciar entre células dañadas y no dañadas.

En la Figura 2 se muestra esquemáticamente el funcionamiento de la técnica de tinción vital. En la línea superior, se muestra una célula cuya membrana no está dañada, en la cual penetra el DAF pero no lo hace el YP, y se produce así en el interior de la misma la fluoresceína que emite luz verde al ser excitada a 490 nm. Por otro lado, la línea inferior representa una célula dañada que incorpora tanto el DAF como el YP, y al ser excitada a 490 nm emite fluorescencia roja.

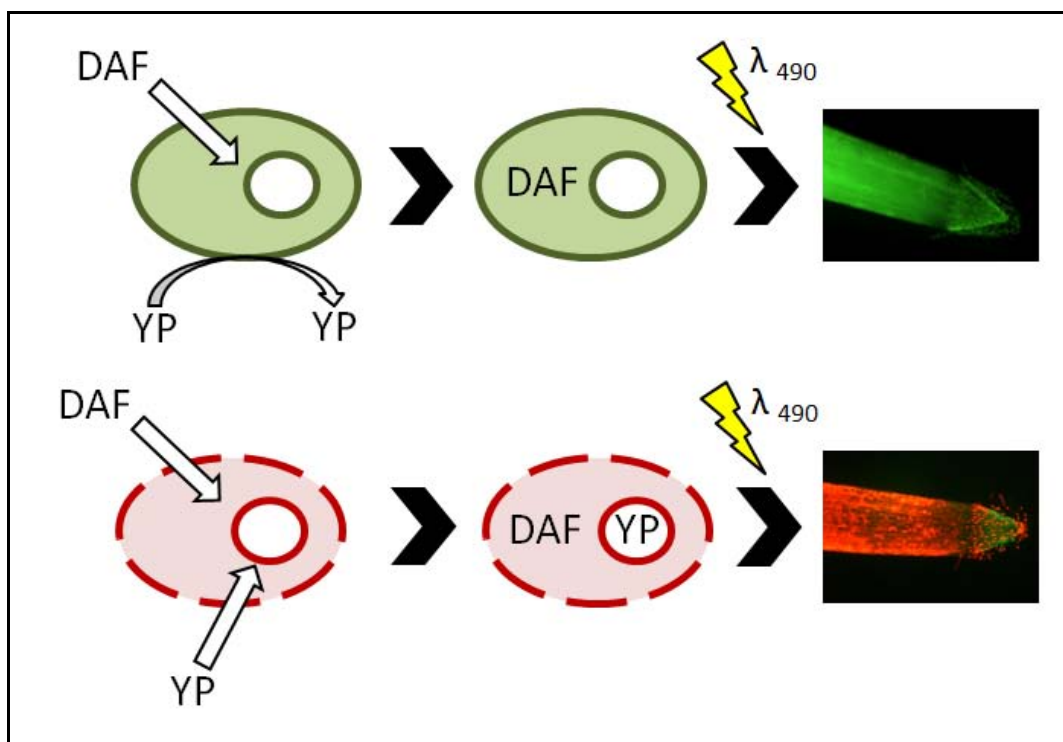


Figura 2. Esquema de la tinción vital.

Las fotografías fueron tomadas mediante un cuerpo de cámara fotográfica convencional Nikon microreflex UFX-DX acoplada al microscopio Nikon Optiphot 2 (Nikon Europe B.V., The

Netherlands) (Figura 3) equipado con una lámpara de mercurio modelo HB-10101AF, filtro B-2A, con un rango de excitación de 450-490 nm, espejo dicroico DM510 y filtro barrera BA520.

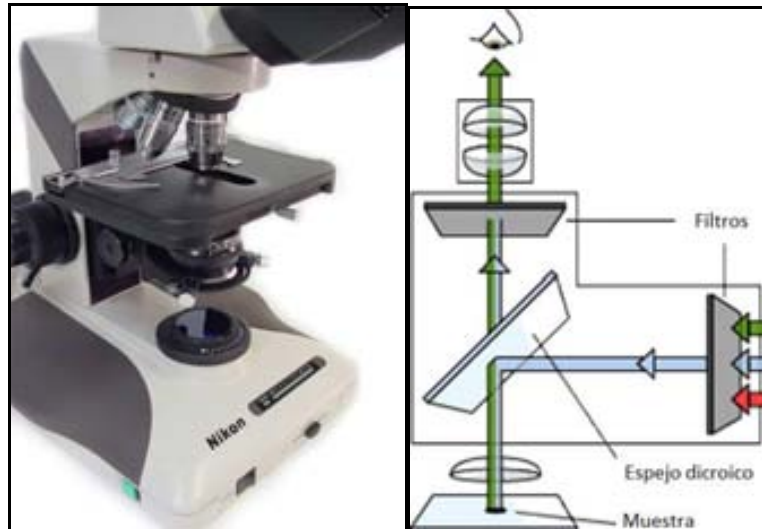


Figura 3. Microscopio Nikon Optiphot 2 y esquema de funcionamiento.

El microscopio de fluorescencia es un microscopio óptico que se utiliza para estudiar las propiedades de sustancias orgánicas o inorgánicas aprovechando el fenómeno de fluorescencia. La mayoría de los microscopios de fluorescencia son de epifluorescencia, es decir, la excitación y la observación de la muestra se realiza desde la parte superior de la misma.

Como se puede observar esquemáticamente en la Figura 3, se genera una luz de una longitud de onda específica, en este caso la fuente es una lámpara de mercurio, y pasa a través de los filtros de excitación. Dicha luz refleja en el espejo dicroico en dirección a la superficie de la muestra, de tal manera que, si ésta es fluorescente, la luz emitida por la misma atraviesa el espejo dicroico y es filtrada para bloquear las longitudes de onda no deseadas y llegar al detector (ojo humano o cámara acoplada).³⁴

2. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta los antecedentes expuestos, el presente estudio tiene los siguientes objetivos específicos:

1. Estudio del efecto de la presencia de mercurio sobre los parámetros fisiológicos del trigo para conocer la sensibilidad de esta planta al estrés por dicho elemento.

2. Análisis de los posibles efectos beneficiosos de la presencia de selenio en sus dos formas inorgánicas sobre la absorción de mercurio por el trigo.

3. Evaluación del efecto del enriquecimiento de trigo con selenio en sus diferentes formas sobre la absorción de los micronutrientes y macronutrientes esenciales para el crecimiento del trigo en un medio contaminado por mercurio.

4. Estudio de los posibles beneficios del selenio frente al estrés por mercurio en cultivos hidropónicos de trigo.

3. EXPERIMENTAL

3. 1. Material vegetal y condiciones de cultivo

La especie vegetal del estudio que se presenta en este capítulo es *Triticum aestivum* cv. Pinzón. de Semillas Fitó S.A, ya descrita en el capítulo anterior. El proceso de germinación también se lleva a cabo en papel de filtro húmedo durante 3 días a 25 °C.

Como paso previo al cultivo para el estudio del efecto del selenio en la absorción de mercurio, se realiza un primer cultivo para estudiar la toxicidad del mercurio en la planta tratada. Para ello, se somete la planta a distintas concentraciones de mercurio (II) en forma de $HgCl_2$, como único componente adicional en la disolución Hoagland del cultivo hidropónico, durante un tiempo de exposición de 5 días. Posteriormente, se elige para el segundo estudio, en presencia de selenio, la concentración de mercurio EC_{50} , es decir, la que en el primer estudio suponga una disminución del crecimiento de las raíces del 50 % con respecto a los cultivos control que no han sido sometidos a la toxicidad de este elemento.

Con el objetivo de obtener resultados más reproducibles, dado que en este estudio, a la presencia del selenio, se suma una variable más como es la concentración de mercurio a determinar también en las muestras cosechadas, en ambos estudios se llevan a cabo los cultivos en cubetas de mayor volumen (7 L) donde se pueden sembrar mayor número de plantas, concretamente un total de 5 plantas por cubeta (Figura 4). Adicionalmente, de la misma manera que en los cultivos descritos en el capítulo 1, cada tratamiento se realiza por duplicado.

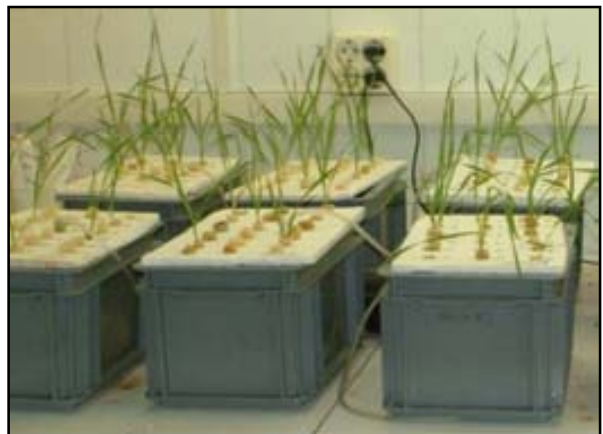
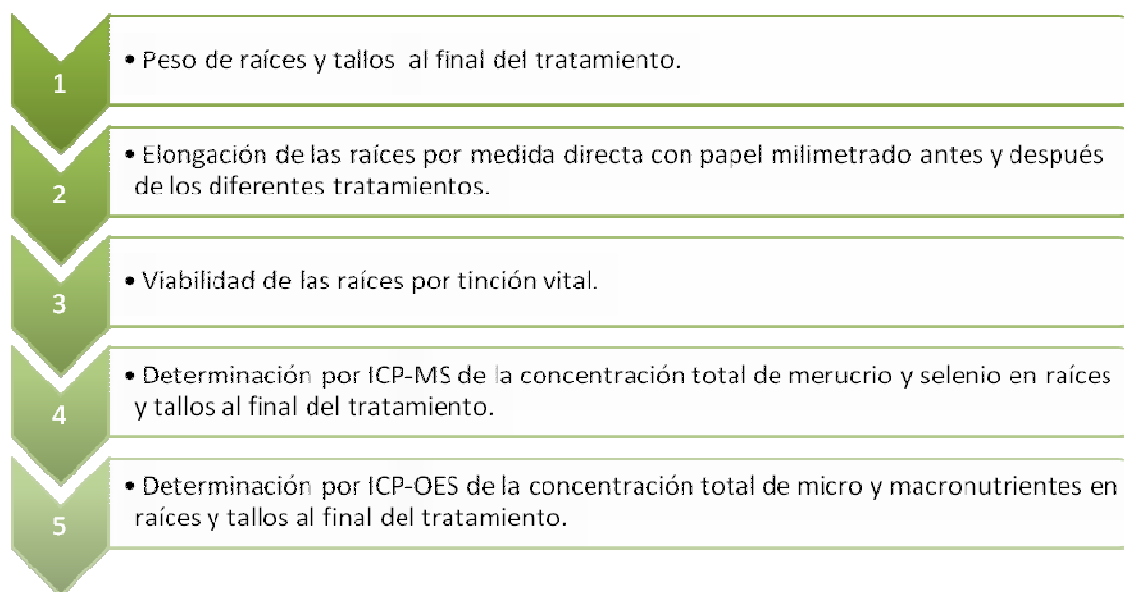


Figura 4. Montaje del cultivo hidropónico.

La aclimatación de las plantas, el período de crecimiento y la composición de la solución Hoagland $\frac{1}{4}$, así como la aireación, el fotoperiodo, la temperatura e intensidad de luz y la

preparativa de muestra son parámetros que no varían en relación a lo detallado en el capítulo anterior.

Las determinaciones que se llevan a cabo en las muestras del presente capítulo al finalizar los correspondientes tratamientos son las siguientes:



3. 2. Tratamientos con mercurio

Como se ha detallado en la introducción, el estudio de la concentración EC_{50} del mercurio se realiza mediante la adición de mercurio a la solución nutritiva Hoagland $\frac{1}{4}$ en forma de cloruro de mercurio, $HgCl_2$ (95 %, Merck, Alemania). Las concentraciones de mercurio en estudio son 1, 2, 5, 10, 20 y 50 μM Hg, realizándose cada tratamiento por duplicado y añadiendo al estudio dos cubetas control donde únicamente hay solución nutritiva Hoagland.

3. 3. Tratamientos con mercurio y selenio

Una vez fijada la concentración EC_{50} del Hg en base a los resultados del primer cultivo, se realizan los tratamientos con las dos especies de selenio en estudio (selenito y selenato). Adicionalmente se somete al trigo al estrés de mercurio para estudiar de que manera afecta la presencia de selenio (bajo sus distintas formas) a la toxicidad observada del mercurio. Concretamente, se realizan cultivos hidropónicos para cada una de las especies de selenio

individuales a los niveles de concentración 1 y 10 μM de selenio en forma de selenito y selenato y, en todos los tratamientos, se aplica la concentración correspondiente al EC_{50} de Hg, según lo indicado. El tiempo de exposición a cada nivel de concentración de las distintas formas de selenio es de 5 días.

3. 4. Tinción vital

Como se ha descrito en el apartado de Técnicas Experimentales, la viabilidad de las raíces se ha determinado mediante la tinción vital con diacetato de fluoresceína (DAF, Sigma Aldrich, EEUU) y yoduro de propidio (YP, Sigma Aldrich, EEUU). Se utiliza también la disolución tampón DPBS (conocida por sus siglas en inglés que significan *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) como medio de limpieza entre las dos tinciones y como medio final para sumergir las raíces tratadas y fotografiarlas. La composición de la disolución es la siguiente: 140 mM NaCl (Panreac, España), 6 mM Na_2HPO_4 (Panreac, España) y 4 mM KH_2PO_4 (Panreac, España) y se ajusta a pH 7,4. Este tipo de disoluciones mantienen las muestras biológicas a un pH fisiológico comprendido entre 7 y 7,6, siendo útiles para limpieza, transporte o dilución de fluidos, manteniendo la viabilidad de las células por un periodo limitado de tiempo.

La disolución madre de DAF se prepara en acetona y tiene una concentración de 5 mg/ml (se conserva congelada y a oscuras debido a su fotosensibilidad). Esta disolución se diluye en DPBS el mismo día que se va a realizar la tinción, tomándose 4 μl por cada mililitro de DPBS necesario. La disolución de YP se prepara disolviendo 1 mg de YP por cada 50 ml de DPBS, se conserva congelada y a oscuras, descongelándose para su uso el día que se va a realizar la tinción.

La toma de muestra se realiza mediante corte con bisturí de las puntas de las raíces (5 mm desde el ápice), se toman 3 puntas de cada tratamiento y el correspondiente control. Las raíces se colocan en portaobjetos moldeados para llevar a cabo las tinciones siguiendo los siguientes pasos sucesivos:

1. Sumergir las raíces en la solución de DAF durante 3 min.
2. Lavar las raíces en la solución de DPBS.
3. Sumergir las raíces en la solución de YP durante 10 min.

4. Volver a lavar las raíces con DPBS y dejarlas en esta solución.
5. Fotografíar directamente con lupa de fluorescencia a 490 nm.

3. 5. Análisis de selenio y mercurio total por ICP-MS

La preparación de las muestras para el posterior análisis de selenio y mercurio por ICP-MS y de la composición nutricional por ICP-OES se ha descrito en el Capítulo 1 (liofilización de raíces y tallos y digestión ácida con microondas analítico). La determinación de las concentraciones de los elementos en juego nos permitirá estudiar los efectos del selenio en la absorción de mercurio y de micro y macronutrientes por parte del trigo.

Para el análisis de mercurio en el material vegetal, se ha utilizado el ICP-MS. Dado que el ICP-MS es una técnica multielemental nos permite la determinación de selenio y mercurio en un único análisis en las muestras que así lo requieran.

Tras la optimización del sistema se procede al análisis de mercurio monitorizando los isótopos de interés (ver Tabla 2) y para el análisis de selenio se procede tal como se detalló en la Tabla 6 del capítulo anterior. Pese a que se indican tres patrones internos monitorizados, para la corrección en la determinación de mercurio se utiliza el ^{115}In , que es el que tiene una masa más similar al mercurio.

Tabla 2. Parámetros de adquisición de datos.

Isótopos de Hg monitorizados	^{199}Hg , ^{200}Hg , ^{201}Hg , ^{202}Hg
Isótopos de patrones internos monitorizados	^{71}Ga , ^{103}Rh , ^{115}In
Tiempo de adquisición por punto	10 s
Replicados por punto	3

Para cada determinación se preparan patrones multielementales de selenio y mercurio a partir de las correspondientes diluciones de disoluciones patrón monoelementales de 1000 ppm de cada elemento (Sigma Aldrich, EEUU). Es bien conocido que hay muchos factores que afectan a la estabilidad del mercurio en solución acuosa, como son la forma de mercurio, el material utilizado para contener las soluciones, la matriz y la preservación de las muestras, como está indicado en los procedimientos de EPA.³⁵ Según estos procedimientos, se consigue estabilizar el

mercurio en solución acuosa ácida mediante la adición de una cantidad traza de una sal de oro, ya que el oro actúa como un fuerte agente oxidante que, en este caso, mantiene el ion Hg (II) en solución al producir un ambiente redox que evita la posible reducción del Hg (II) que ocasionaría pérdida por volatilización del mercurio reducido. Concretamente, en este estudio se añade una concentración de 200 ppb de Au (cantidad considerada suficiente para los niveles de mercurio presente, a pesar que en el procedimiento EPA se indique el uso de 1 ppm de oro) a todas las muestras y patrones por dilución de un patrón monoelemental de 1000 ppm Au (AuCl₃, 5 % HCl, JTBaker, Holanda).

Como se ha indicado anteriormente, se trabaja con calibración *Matrix-matched* y se valida la metodología analítica mediante la fortificación de muestras con selenio y mercurio antes y después de las digestiones, blancos y patrones control.

3. 6. Análisis de la composición nutricional

Para evaluar si la presencia de selenio disminuye los efectos tóxicos del mercurio en el trigo se compara la composición nutricional de las plantas control que únicamente contienen mercurio frente a las tratadas con mercurio y selenio, evaluando así posibles efectos que alivien la fitotoxicidad del mercurio. Los macronutrientes y micronutrientes que se analizan por ICP-OES son los mismos que los estudiados en el Capítulo I.

3. 7. Análisis de datos

Tal y como se indica en el Capítulo 1, el análisis estadístico de los datos se ha realizado por comparación de medias entre los distintos tratamientos mediante el t-test para dos muestras con un nivel de significación de 0,05, utilizando el programa estadístico SPSS ya utilizado en el Capítulo anterior. De la misma manera, todos los resultados se expresan como promedio de 4 replicados (análisis de cuatro de las cinco plantas) con sus correspondientes desviaciones estándar, dado que de las 5 plantas de cada tratamiento una se reservó para ensayos en sincrotrón.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Efectos del mercurio en los parámetros fisiológicos del trigo

De la misma manera que se estudiaron los efectos del selenio en los parámetros fisiológicos del trigo y que recoge el capítulo 1, en el presente capítulo se describen los estudios correspondientes al efecto de la presencia de mercurio en los cultivos hidropónicos de trigo. En estos estudios, se evalúan los siguientes parámetros fisiológicos de crecimiento:

- Peso fresco del tallo y de la raíz (Figura 5.a).
- Crecimiento en elongación de las raíces (Figura 5.b).
- Viabilidad de las raíces por tinción vital (Figura 6).

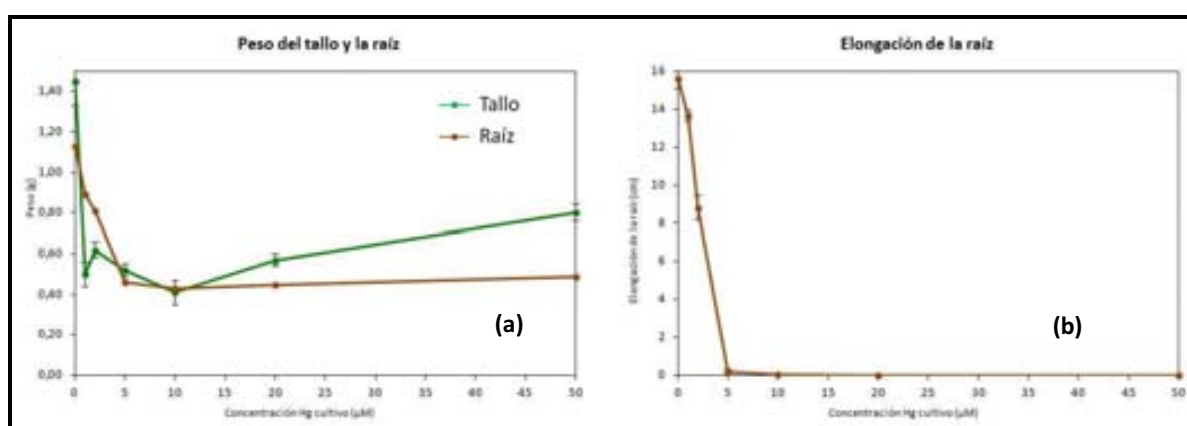


Figura 5. Efectos del mercurio en los parámetros de crecimiento del trigo después de 5 días de exposición: peso fresco del tallo y de la raíz (a) y elongación de la raíz (b). Los valores graficados son promedios \pm el error estándar (n=4).

La variación del peso fresco del tallo y las raíces (Figura 5.a) sigue una tendencia similar al aumentar la concentración de mercurio del cultivo, observándose un decrecimiento marcado del peso fresco de ambas partes alcanzando un mínimo a 10 μM de Hg. A partir de 10 μM se mantiene constante el peso fresco de las raíces mientras que se observa un ligero aumento en el peso fresco de los tallos.

En la Figura 5.b se muestra la variación de la elongación de las raíces en función de la concentración de mercurio de cada cultivo. Como se puede observar, la elongación desciende

drásticamente con el aumento de la concentración de mercurio a la que se expone el trigo. Se alcanza la elongación mínima en el tratamiento con 5 μM de Hg, siendo prácticamente nula, y ésta se mantiene en los tratamientos a concentraciones superiores (10, 20 y 50 μM). El objetivo de este estudio es determinar el EC_{50} , así pues, gráficamente se observa que la concentración externa de mercurio que inhibe en un 50 % la elongación de la raíz es de 2 μM .

Estas disminuciones que se observan del peso fresco y la elongación de las raíces al aumentar las concentraciones de mercurio en el cultivo son bien conocidas y se debe a que las plantas que se exponen a condiciones medioambientales desfavorables, como puede ser la presencia de mercurio, pierden la capacidad de metabolizar la eliminación de las especies reactivas de oxígeno (ROS, del término en inglés *Reactive Oxygen Species*). Dichas especies son moléculas muy pequeñas altamente reactivas que se forman de manera natural como subproducto del metabolismo normal del oxígeno y tienen un importante papel en la señalización celular. Sin embargo, en situaciones de estrés ambiental sus niveles pueden aumentar notablemente, lo cual resulta en daños significativos en las estructuras celulares y, en consecuencia, una inhibición del crecimiento, situación conocida como estrés oxidativo.^{36,37,38}

La técnica de tinción vital permite identificar el daño en la membrana celular de las raíces provocado por la exposición al mercurio. Las fotografías tomadas (Figura 6), indican claras diferencias entre la raíz control y las expuestas a distintas concentraciones de mercurio. La presencia de fluorescencia verde muestra que las células no presentan membranas dañadas mientras que la detección de algunas células de color rojo significa la entrada de YP en el interior celular debido a lesiones en la membrana. El estrés oxidativo al que se ve expuesto el trigo por la presencia de mercurio, tiene como consecuencia principal la oxidación de varias macromoléculas como los lípidos y las proteínas, principales constituyentes de las membranas celulares vegetales.^{39,40}

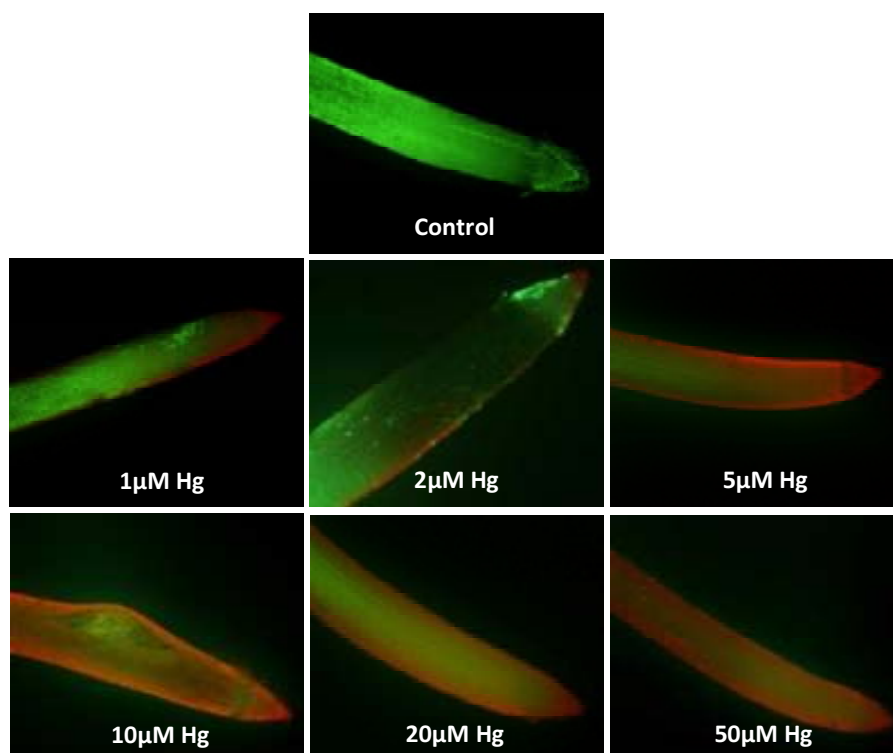


Figura 6. Tinción vital en puntas de raíz del trigo tratado con distintas concentraciones de mercurio.

En el ápice de la raíz control (ver Figura 6) no se distingue daño alguno en la membrana celular. Por el contrario, en presencia de mercurio, se observan daños evidentes que son cada vez más acusados a medida que aumenta la concentración de exposición a mercurio de 1 a 5 μM , estabilizándose el nivel de daño celular a partir de esta concentración y hasta el nivel máximo de 50 μM . Esto explicaría que la causa de la inhibición del crecimiento de las raíces con el incremento de la presencia de mercurio, es debido a un daño físico estructural de la membrana. A modo de ejemplo, tanto la inhibición del crecimiento (en elongación y peso) como el daño estructural de las raíces al aumentar la exposición a mercurio, se observa claramente en la Figura 7 donde se comparan las imágenes a escala real de las raíces control y las expuestas a 2 μM y 50 μM de Hg.

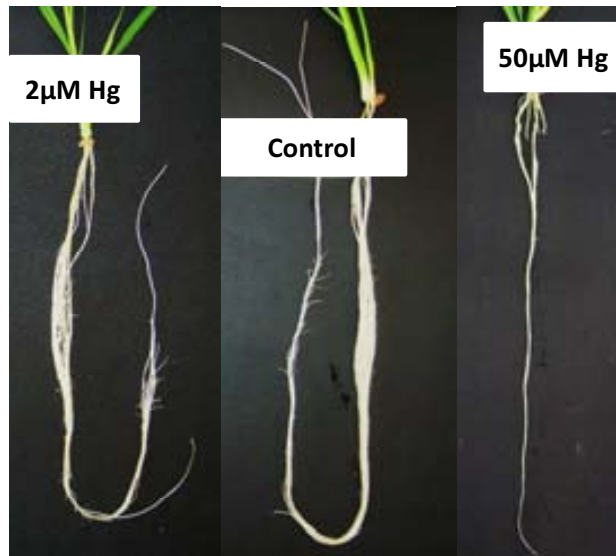


Figura 7. Comparación visual de las raíces control y las expuestas a concentraciones 2 y 50µM de Hg al final del tratamiento hidropónico.

Así pues, quedan demostrados los efectos toxicológicos del mercurio al aumentar su concentración en el cultivo hidropónico del trigo en estudio y se ha determinado un EC_{50} de 2 µM Hg. Es por ello que con este valor de concentración constante de mercurio, se llevan a cabo los estudios en presencia de selenio y mercurio para evaluar los posibles efectos de mejora o alivio del selenio frente a la toxicidad del mercurio, estudio cuyos resultados se detallan a continuación.

4. 2. Efectos de la presencia simultánea de selenio y mercurio sobre los parámetros fisiológicos del trigo

Con la concentración de mercurio fijada en 2 µM (EC_{50}) se llevan a cabo los estudios del posible efecto beneficioso de la presencia de selenio (1 y 10 µM) en forma de las especies selenito y selenato. Es importante remarcar, que en los experimentos denominados *Control* que se muestran en este apartado, no hay presencia de selenio pero si la hay de mercurio, al nivel fijado de 2 µM, para evaluar como afecta la presencia de selenio en la absorción de mercurio.

Así como han mostrado los resultados de los efectos del mercurio aplicado individualmente en los parámetros fisiológicos, en el presente apartado, se muestran los

resultados de los efectos de la exposición a mercurio en presencia de selenio. Concretamente se han analizado los siguientes parámetros fisiológicos:

- Peso fresco del tallo y de la raíz (Figura 8.a y Figura 8.b).
- Crecimiento en elongación de la raíz (Figura 8.c).
- Viabilidad de las raíces por tinción vital (Figura 9).

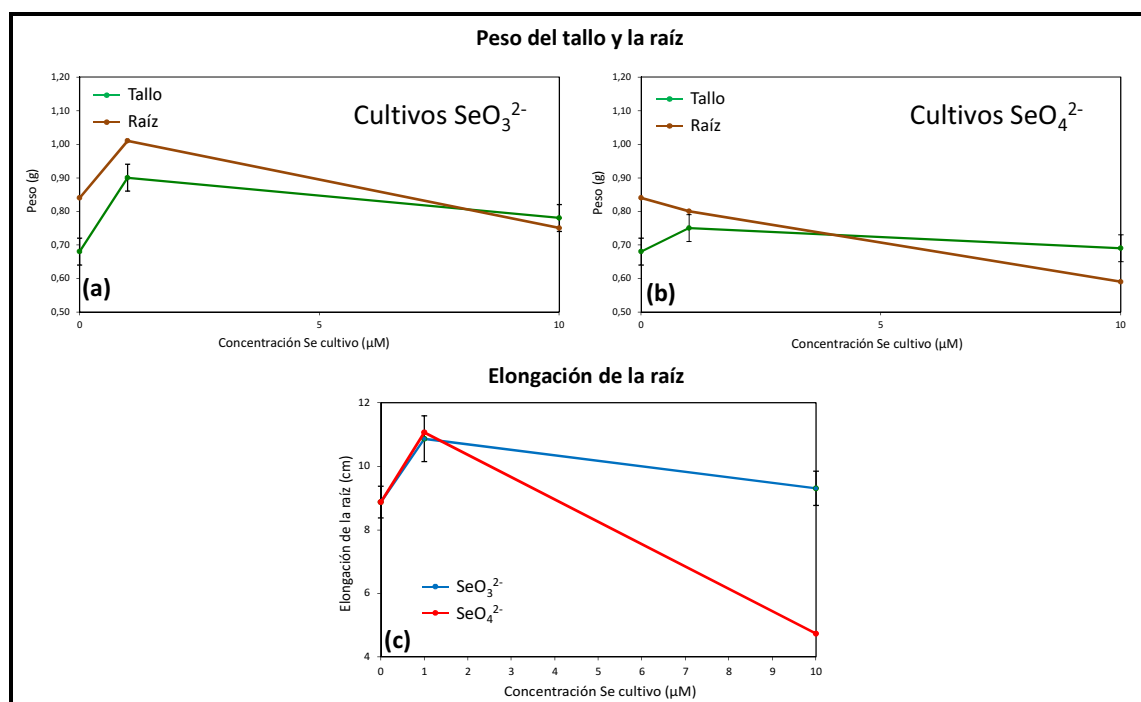


Figura 8. Efectos del mercurio en presencia de selenio (en forma de selenito y selenato) sobre los parámetros de crecimiento del trigo después de 5 días de exposición: peso fresco del tallo y de la raíz en cultivos de SeO_3^{2-} (a) y de SeO_4^{2-} (b) y elongación de la raíz (c). Los valores graficados son promedios \pm el error estándar ($n=4$).

En los cultivos con 1 μM de Se en forma de selenito el peso fresco de raíces y tallos aumenta notablemente en comparación con el control 2 μM de Hg (Figura 8.a), beneficiando así el crecimiento de la planta. Posteriormente se observa un ligero descenso llegando valores cercanos al control. Por el contrario, los tratamientos con selenato (Figura 8.b) muestran en la raíz un descenso claro del peso fresco y en los tallos no hay variaciones significativas con respecto al control.

En la Figura 8.c se observa, que para ambos tratamientos, a concentración 1 μM de Se en presencia de mercurio, hay un aumento marcado de la elongación de la raíz, indicando un

posible efecto hormético del selenio al ser beneficioso a bajas concentraciones pero suponer toxicidad por parte de ambos elementos a concentraciones más altas. Al aumentar la concentración de selenio a 10 μM , en el caso del selenito, no hay una variación de la elongación significativa. Por el contrario, en el caso del selenato, hay un drástico descenso de la elongación al nivel 10 μM de Se.

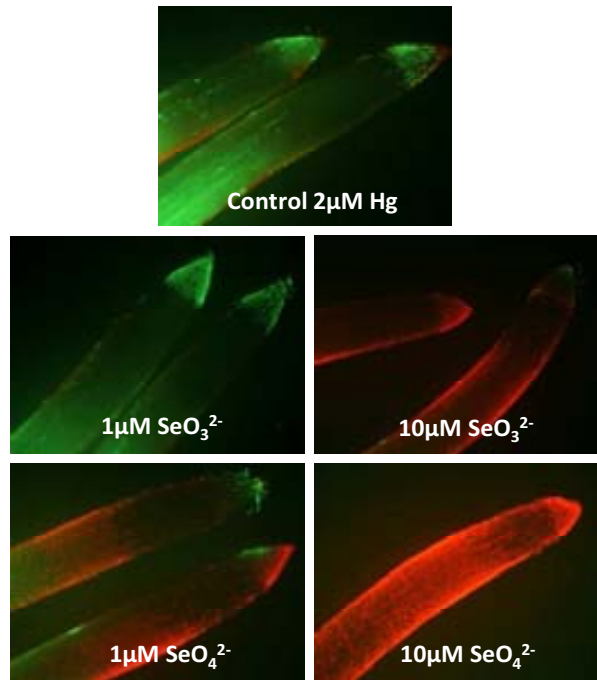


Figura 9. Tinción vital en puntas de raíz del trigo tratado con distintas concentraciones de selenito y selenato en presencia de mercurio 2 μM .

En lo que se refiere a la tinción vital (Figura 9), si se comparan las imágenes del control 2 μM de Hg y la del tratamiento con 1 μM de Se en forma de selenito, se observa que el selenito hace disminuir los efectos toxicológicos de la presencia de mercurio que se observan en el control, ya que hay una clara disminución de la fluorescencia roja. Por el contrario, las imágenes del resto de tratamientos muestran daños evidentes en las membranas celulares, especialmente los tratamientos al nivel de concentración de selenio mayor.

Los resultados de la tinción vital se correlacionan con lo observado en los efectos en los parámetros fisiológicos, denotando que el selenio en forma de selenito podría tener algún efecto fitoremediante dado que, pese a la presencia de mercurio en el medio, hace aumentar el

peso fresco de la planta, da lugar a una mayor elongación radicular y hace disminuir los daños en la membrana celular provocados por el mercurio.

En el capítulo 1, los estudios en ausencia de mercurio en el medio mostraron una mayor toxicidad del selenito que del selenato mientras que en el presente capítulo, en presencia de mercurio, se invierten los efectos toxicológicos siendo el selenato más fitotóxico. Varios estudios recientes en matrices vegetales demuestran que el selenito forma complejos mixtos con el mercurio que se enlazan a proteínas atenuando la toxicidad del mercurio. Esto podría explicar los efectos beneficiosos observados y la inversión de la toxicidad del selenito frente al selenato en presencia de mercurio.^{25,41} Por otro lado, asumiendo que el selenato puede ser reducido a selenito para posteriormente formarse los correspondientes selenoaminácidos, cabría esperar que, en presencia de selenato, también se formaran complejos Se-Hg enlazados a proteínas. Según los resultados, se podría decir que, en el hipotético caso de que lo comentado anteriormente sucediera, lo hace en menor medida que en el caso del selenito, lo cual justificaría los efectos beneficiosos del selenito frente al selenato en presencia de mercurio. Estos resultados concuerdan con lo observado en el capítulo 1, en que el selenato mostraba mayor translocación hacia el tallo, lo cual evitaría que la formación en la raíz de los complejos mixtos Se-Hg tuviese lugar en la misma extensión que en el caso del selenito, quedando justificado así el distinto comportamiento de ambas especies en presencia de mercurio.

En la Figura 10 se observan algunos de los efectos descritos en el presente apartado y una verificación de lo explicado anteriormente en una planta cosechada de cada cultivo:

- En las plantas de los cultivos 1 μM de Se en forma de SeO_3^{2-} y SeO_4^{2-} se ven algo más voluminosos los tallos y ligeramente más largas las raíces que el control 2 μM de Hg, lo cual es una clara indicación del efecto beneficioso del selenio presente en cualquiera de sus formas.

- La planta enriquecida con 10 μM de SeO_3^{2-} muestra algunos síntomas de inhibición de crecimiento de la raíz pero poco marcados y no parece variar el volumen de los tallos denotando los efectos beneficiosos observados para el selenito.

- La planta cultivada en la solución de 10 μM de SeO_4^{2-} denota una clara disminución del peso de los tallos, así como su marchitamiento y una disminución de la elongación y el volumen de las raíces, lo cual demuestra los efectos más beneficiosos del selenito frente al selenato.



Figura 10. Comparación visual, al final del cultivo hidropónico, de una planta control ($2 \mu\text{M Hg}$) y de las plantas expuestas a los distintos tratamientos con selenio en presencia de la misma concentración de mercurio.

4. 3. Efectos del selenio en la absorción de mercurio

A continuación se presentan los resultados de la distribución de mercurio en las raíces y los tallos de las plantas sometidas a distintos tratamientos con selenio en presencia de mercurio $2 \mu\text{M}$ (Figura 11).

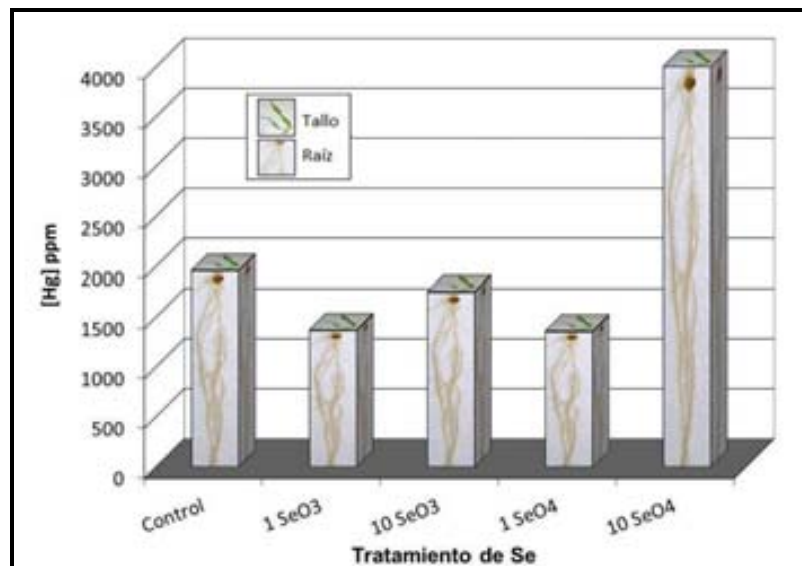


Figura 11. Concentración total de mercurio en ppm y su distribución en tallo y raíz para cada uno de los tratamientos de selenio en presencia de $2 \mu\text{M}$ de Hg.

Si se evalúa la concentración total de mercurio acumulada en la planta, los tratamientos con un nivel de concentración de selenio de 1 μM , tanto para selenito como para selenato, suponen un descenso de la acumulación de mercurio al compararse con el control (2 μM Hg), observándose así un claro efecto beneficioso al inhibirse parcialmente la absorción del mercurio. Adicionalmente, este efecto correlaciona con los efectos positivos observados en la elongación de las raíces y el aumento del peso fresco, además de los daños mínimos observados en la tinción vital.

En el proceso de crecimiento radicular, los exudados de la raíz liberan pequeñas cantidades de ácidos orgánicos que pueden disminuir ligeramente el pH de la disolución de cultivo y facilitar la reducción del selenito y el selenato a seleniuro, de acuerdo con las características oxido-reductoras del sistema.⁴² En estudios de Shanker et al.^{43,44} observaron que el seleniuro (Se^{2-}) puede formar un complejo estable con el ion Hg^{2+} (HgSe)⁴⁵ altamente insoluble y, en consecuencia, difícilmente biodisponible para ser absorbido por las raíces de las plantas. Adicionalmente, en dichos estudios se afirma que las bajas concentraciones de los exudados radiculares son capaces de reducir, únicamente, bajos niveles de selenito y selenato en los alrededores de la raíz. Este hecho explicaría la disminución de la absorción de mercurio en presencia de selenio a concentraciones bajas (1 μM Se), tanto en el caso del selenito como en el del selenato. En consecuencia, también explicaría los efectos beneficiosos observados en el crecimiento de la planta en lo que a aumento del peso fresco y elongación radicular se refiere.

En los experimentos llevados a cabo con una concentración de selenio de 10 μM , en el caso del selenito, la absorción de mercurio es ligeramente inferior al control pero superior al experimento 1 μM , mientras que, en el caso del selenato, la absorción de mercurio se llega a doblar con respecto al control. Este marcado aumento en la absorción de mercurio en el caso del selenato se puede explicar en base a la mayor difusión en la planta del selenato frente al selenito, lo cual evita la posible formación de SeHg insoluble en la solución de cultivo y, en consecuencia, que la absorción de mercurio quedara bloqueada. El elevado coeficiente de difusión del selenato, conjuntamente con la fuerte interacción entre el par iónico formado por el anión SeO_4^{2-} y el catión Hg^{2+} , son los causantes del elevado aumento en la absorción de

mercurio en presencia de altas concentraciones de selenato. Estos resultados se correlacionan con la drástica inhibición de la elongación de la raíz para el tratamiento con selenato y el aumento de los daños celulares observados en la tinción vital tanto para selenito como para selenato, al nivel de concentración más alto.

En el caso del selenito, a concentraciones altas, se puede asumir que se da la formación de HgSe en solución pero en menor medida, lo cual justificaría que la absorción de mercurio sea ligeramente inferior al control pero algo superior al cultivo 1 μM Se. Por el contrario, en el caso del selenato, los exudados radiculares no parecen tener suficiente capacidad para favorecer la formación de HgSe en solución y minimizar la absorción del fitotóxico. Cabe destacar que el camino energético del selenato para ser reducido a seleniuro es más largo que el del selenito y, al mismo tiempo, que el selenato sea absorbido por la planta con más facilidad debido a su mayor difusión con respecto al selenito. Así pues, en presencia de altas concentraciones de selenato (10 μM) se ve favorecido que el mercurio sea absorbido por las raíces y, en consecuencia, se observan claros efectos inhibidores del crecimiento radicular y graves daños en las membranas celulares, situación conocida como estrés oxidativo.

En lo que se refiere a la distribución del mercurio en las distintas partes del trigo, queda claramente definido en las barras de distribución de la Figura 11 que, para todos los tratamientos, el mercurio se acumula mayoritariamente en las raíces, siendo en todos los casos inferior al 1 % la cantidad de mercurio que es transportada de la raíz a los tallos. La tendencia del mercurio por acumularse en la raíz y no ser transportado hacia los tallos también se observa en todos los estudios referenciados en la Tabla 1. Concretamente, en los citados estudios, justifican la acumulación de mercurio en las raíces por la formación de complejos Se-Hg enlazados a proteínas que quedan secuestrados en ellas y la planta no es capaz de transportar a los tallos debido a su alto peso molecular, lo cual sustentaría los resultados presentados.

4. 4. Efectos del mercurio en la absorción de selenio

A parte de los efectos del selenio en la absorción de mercurio detallados en el apartado anterior, para entender mejor la respuesta del trigo es necesario evaluar también los efectos de la presencia de mercurio en la absorción y distribución del selenio por comparación con los

resultados de los cultivos en ausencia de mercurio del capítulo 1. La Figura 12 muestra gráficamente esta comparativa.

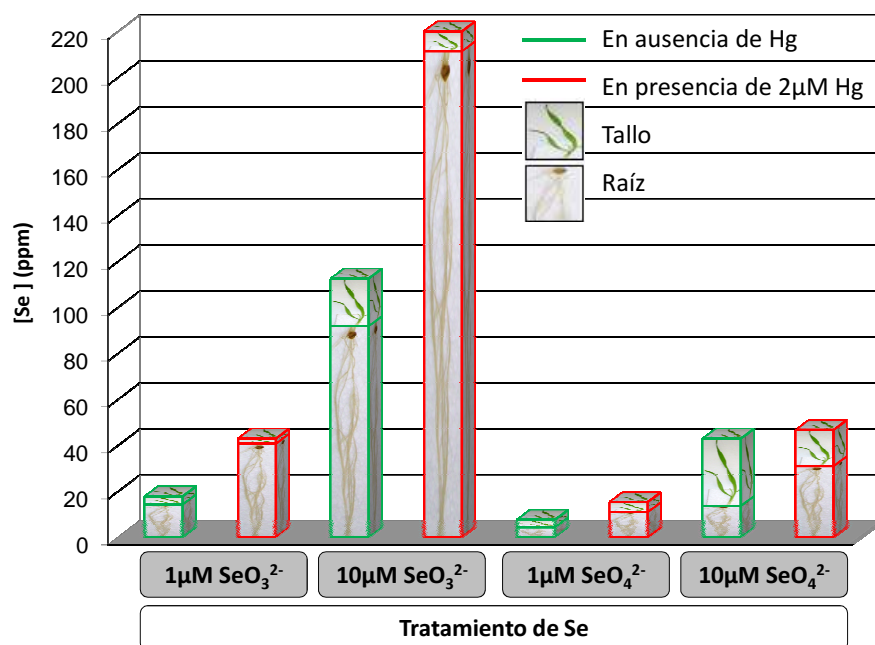


Figura 12. Gráfica comparativa de la concentración total de selenio en ppm y su distribución en tallo y raíz para cada uno de los tratamientos de selenio en ausencia de mercurio y en presencia de 2µM de Hg.

Con respecto a la Figura 12, en primer lugar, es importante destacar que, en todos los casos la concentración de selenio en los tallos disminuye en los cultivos en presencia de mercurio. Esta observación concuerda con la hipótesis de la posible formación de complejos mixtos Se-Hg enlazados a proteínas cuyo volumen sería demasiado grande para translocarse con facilidad hacia los tallos.

En los tratamientos con selenito se observa un claro aumento de la absorción de selenio en presencia de mercurio para ambos niveles de concentración del enriquecimiento. Adicionalmente, se ha visto que la presencia de selenito hacía disminuir la absorción de mercurio. En una primera etapa, los exudados de ácidos orgánicos de las raíces, provocan una disminución de pH que supone que una parte del selenito sea reducido a seleniuro y precipite como HgSe, lo cual explica la disminución de la absorción de mercurio. En una segunda etapa, la fuerte afinidad entre el selenito y el mercurio para formar complejos Se-Hg unidos a proteínas,

es lo que da lugar al aumento en la absorción de selenio en presencia de mercurio. Estas dos etapas llevan a la conclusión de que hay un claro efecto beneficioso del selenito, ya que éste minimiza la absorción de Hg^{2+} inorgánico favoreciendo la formación de complejos Se-Hg enlazados a proteínas cuya toxicidad es menor. Este efecto se da en las raíces, ya que si se evalúa la distribución de selenio en las partes de la planta, se observa que en presencia de mercurio la acumulación de selenio en la raíz aumenta ligeramente con respecto a los tratamientos en su ausencia.

Teniendo en cuenta los efectos en los parámetros fisiológicos hay que considerar como nivel beneficioso, tan solo la concentración de $1 \mu\text{M}$ de Se en forma de SeO_3^{2-} , ya que al nivel $10 \mu\text{M}$, se observaron claros efectos toxicológicos con la tinción vital, muy probablemente debidos a la toxicidad provocada por la potenciada absorción de selenito, cuyos efectos fitotóxicos se estudiaron en el capítulo anterior.

En el caso del selenato hay que diferenciar los dos niveles de enriquecimiento, ya que no se observan los mismos efectos. En el caso del nivel $1 \mu\text{M}$, el efecto observado en la acumulación y distribución del selenio es el mismo que el descrito para el selenito, hay un aumento significativo de la absorción de selenio, y éste se distribuye en mayor cantidad en las raíces. No obstante, los resultados de la tinción vital no permiten atribuir este comportamiento a un efecto alivante. Por otro lado, para el nivel $10 \mu\text{M}$ de Se en forma de SeO_4^{2-} , los efectos son totalmente distintos. La acumulación de selenio total, es prácticamente la misma, pero éste pasa a acumularse mayormente en las raíces, mientras que en ausencia de mercurio, el selenato se acumulaba mayormente en los tallos. En los apartados anteriores se ha demostrado que la presencia de selenato al nivel $10 \mu\text{M}$ potenciaba notablemente la absorción de mercurio y mostraba los peores efectos fitotóxicos, correlacionándose adecuadamente todo ello con los resultados de acumulación y distribución de selenio aquí descritos.

4. 5. Efectos del selenio y el mercurio en la absorción de nutrientes esenciales

En este apartado se exponen los resultados del análisis de la concentración de macronutrientes (Ca, K, Mg, P y S) y micronutrientes (Cu, Fe, Mn y Zn) en los tallos y raíces del

trigo tras los diferentes tratamientos de selenio en presencia de mercurio 2 μM para evaluar el efecto que tiene su presencia, en la absorción de nutrientes, de la misma manera que se estudió este efecto en el Capítulo 1 en ausencia de mercurio.

En las Figura 13 y Figura 14 se muestran las concentraciones de los nutrientes esenciales analizados por ICP-OES en raíces (eje izquierdo de los gráficos) y tallos (eje derecho de los gráficos) para los siguientes cultivos:

- Control 2 μM Hg, 1 y 10 μM Se en forma de SeO_3^{2-} en presencia de 2 μM Hg.
- Control 2 μM Hg, 1 y 10 μM Se en forma de SeO_4^{2-} en presencia de 2 μM Hg.

En términos generales, se observa que los macronutrientes se acumulan mayormente en los tallos mientras que los micronutrientes lo hacen en las raíces, esto indica que la translocación de los macronutrientes se ve favorecida en detrimento de la de los micronutrientes. Es importante destacar también, que no se observa redistribución de los elementos entre las raíces y los tallos para ningún macronutriente ni micronutriente con respecto a las muestras de control.

Si se comparan las tendencias acumulativas en raíces y tallos, para cada nutriente, se observa que las tendencias son muy similares para la mayoría de macronutrientes exceptuando el azufre. Por otro lado, en los micronutrientes se observa que las tendencias se ven más afectadas por la presencia de selenio y mercurio. Los micronutrientes, que presentan mayores niveles de concentración en las raíces, se ven más afectados por la presencia de otro elemento, en este caso el selenio y el mercurio, ya que las raíces son la puerta de entrada fisiológica de la mayoría de nutrientes.

A continuación se presentan separadamente los resultados y la discusión de los efectos del selenio en la absorción y translocación de macro y micronutrientes en presencia de una concentración constante 2 μM de Hg con el objetivo de detectar posibles efectos beneficiosos, es decir, efectos de enriquecimiento nutricional de la planta, al entrar en juego el selenio en presencia del fitotóxico mercurio.

4.5.1. Efectos en los macronutrientes

Para todos los macronutrientes se observa que una disminución de la acumulación de un macronutriente en las raíces, no va compensada por la acumulación en los tallos. Otra observación general, es la disminución, más o menos marcada, de los niveles de todos los macronutrientes cuando se expone al trigo a concentraciones de 10 μM de Se en cualquiera de sus formas. Esto explicaría los efectos fitotóxicos observados a elevadas concentraciones en los estudios del resto de parámetros fisiológicos mostrados en el presente capítulo. Siendo la única excepción el caso del azufre en las plantas expuestas a concentraciones 10 μM de Se en forma de SeO_4^{2-} . Esto mismo sucedía en el capítulo anterior para este mismo macronutriente y tratamiento.

En la Figura 13.a se observa que la absorción de calcio no se ve especialmente afectada por la presencia de selenio cuando en el medio hay mercurio. Tan solo hay una ligera disminución de los niveles de calcio en raíces y tallos cuando aumenta la concentración de selenio.

La absorción de potasio (Figura 13.b) sigue una misma tendencia en los tratamientos con selenito y selenato al nivel 1 μM , mientras que al aplicarse concentraciones de 10 μM los niveles de potasio bajan drásticamente.

En el caso del magnesio (Figura 13.c), su absorción no se ve significativamente alterada por la adición de selenio y mercurio en los tallos, mientras que en las raíces, si que se observan algunos efectos. Concretamente, en los tratamientos con ambas especies de selenio, se produce un ligero aumento de la absorción de magnesio al nivel 1 μM mientras que ésta disminuye marcadamente al nivel de 10 μM .

El estudio de la absorción de fósforo se muestra en la Figura 13.d. Tanto en las raíces, como en los tallos, no hay una diferencia significativa en su absorción si se comparan los controles con los enriquecimientos 1 μM . En cambio, en todos los tratamientos, la disminución de la absorción de este macronutriente disminuye significativamente, de forma más marcada en presencia de selenato.

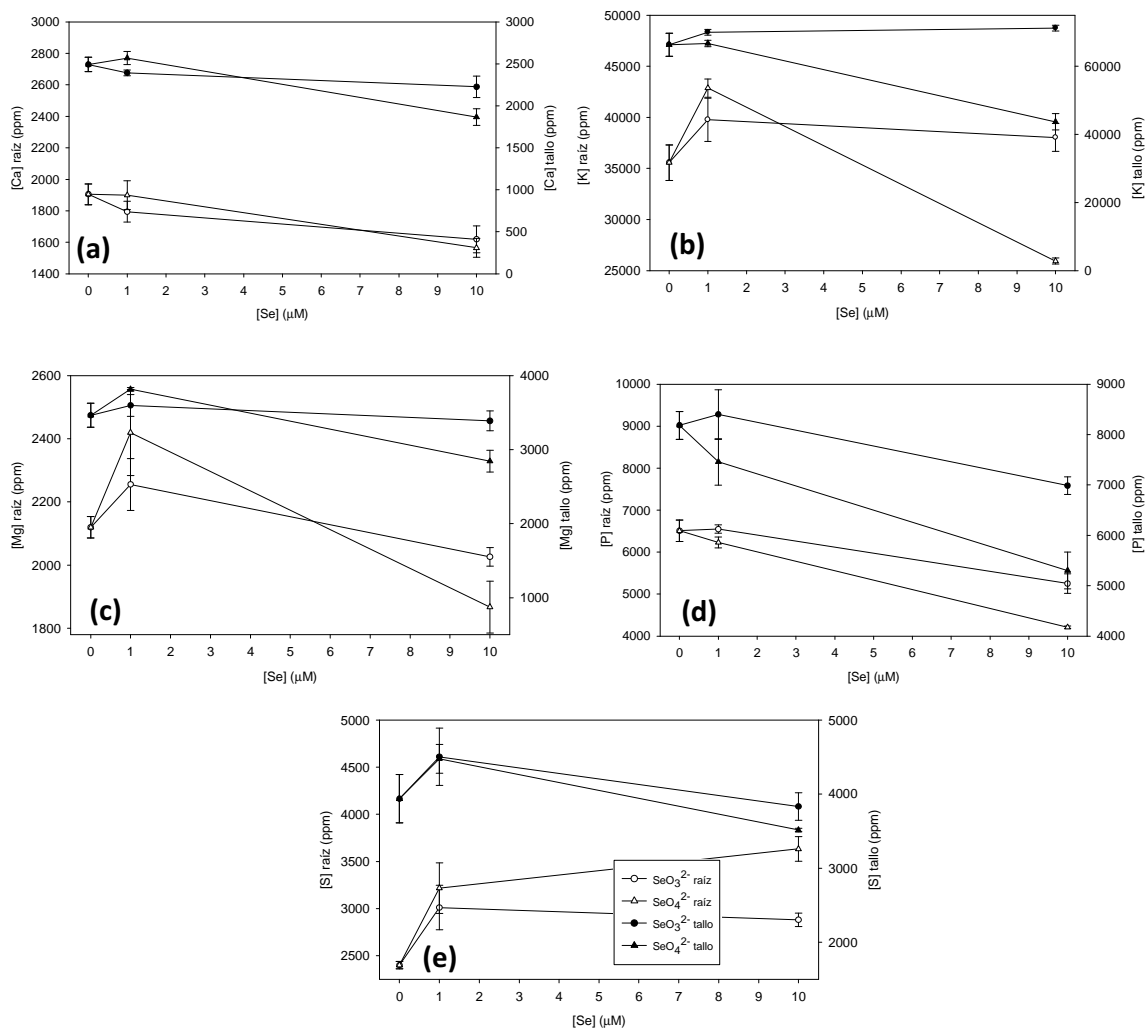


Figura 13. Concentración de macronutrientes en raíces (símbolos abiertos) y tallos (símbolos cerrados) tras 5 días de exposición a selenio en forma de selenito (SeO_3^{2-} , círculos) o selenato (SeO_4^{2-} , triángulos) en presencia de una concentración $2 \mu\text{M}$ de Hg.

Finalmente, en la Figura 13.e se muestran los efectos en la absorción de azufre. Este macronutriente no se ve especialmente afectado en su acumulación en los tallos, tan solo se observa un ligero descenso en los tratamientos $10 \mu\text{M}$ de Se. Es en las raíces, donde se ven diferencias más significativas. La primera observación es el claro aumento en su absorción en presencia de $1 \mu\text{M}$ de Se en ambas formas, nivel que se mantiene para el tratamiento $10 \mu\text{M}$ de SeO_3^{2-} pero que aumenta significativamente para el caso del selenato. Este es el único caso en que hay un cambio en la tendencia acumulativa raíz-tallo. Esta excepción en el caso del azufre podría explicarse por la posible interacción del mercurio presente en el medio con el selenio, lo

cual favorecería la absorción del azufre, elemento con el que el selenio compite bioquímicamente. El incremento de la concentración total de tioles (R-SH) en tejidos vegetales, es un mecanismo bien conocido de resistencia a elementos traza, el cual sería posible como respuesta a la toxicidad del selenato y el mercurio, y de este modo, el trigo indujera a la formación de tioles, lo cual explicaría el aumento de la concentración de azufre para este tratamiento en concreto.³⁹

Los resultados de la absorción de macronutrientes concuerdan con los efectos beneficiosos observados para el selenito al nivel 1 μM de Se, ya que para todos los macronutrientes, las concentraciones aumentan o bien se mantienen, pero nunca disminuyen comparando siempre con el control 2 μM Hg.

4.5.2. Efectos en los micronutrientes

En términos generales, se observa en las raíces, que al nivel 1 μM , todos los micronutrientes aumentan o mantienen su concentración en planta con respecto al control, lo cual supone un efecto beneficioso. En el caso de los tallos, no se observa la misma tendencia para todos los micronutrientes. Otra observación general es que el hierro es el micronutriente que se acumula en mayor concentración y el cobre el que se encuentra a niveles más bajos. En cambio, al nivel 10 μM se observa en todos los casos un efecto negativo en la absorción de micronutrientes exceptuando el caso del zinc en los tratamientos con selenito.

La Figura 14.a muestra la absorción del cobre, la cual no se ve significativamente afectada por la presencia de selenio y mercurio en los tallos mientras que en las raíces hay variaciones notables. Al nivel 1 μM de Se la absorción de cobre se ve claramente potenciada mientras que el aumento del nivel de selenio provoca un fuerte descenso hasta casi alcanzar los niveles control.

La variación de la absorción de hierro se ve reflejada en la Figura 14.b. Este micronutriente tan solo aumenta sus niveles significativamente cuando se somete el trigo al tratamiento con 1 μM de SeO_4^{2-} , el resto de tratamientos suponen un descenso en su acumulación, que es más drástico a mayor concentración de selenio.

En la Figura 14.c se observa que los tratamientos con 1 μM de Mn no suponen variaciones significativas con respecto al control tanto en raíces como en tallos. No sucede lo mismo a

niveles de concentración mayor, donde se observa un claro descenso de la concentración de manganeso para todos los tratamientos, especialmente marcado en el caso del selenato. Si comparamos los niveles de concentración de todos los micronutrientes en los tallos, el manganeso es el que se encuentra en niveles de concentración mayor, lo cual concuerda con los resultados publicados por Millaleo et al. en que demostraron que, también en trigo, este elemento tiende a translocar fácilmente hacia los tallos.⁴⁶

Por último, en la Figura 14.d se presenta el único caso en que la presencia de selenio y mercurio supone un aumento de la absorción de un micronutriente, en este caso, el zinc acumulado en los tallos al enriquecerse el cultivo con selenito. El zinc es conocido como un elemento que supone una reducción significativa del estrés oxidativo que provoca el mercurio.^{47,48,49}

Como ya se observó en el capítulo 1, niveles elevados de selenio pueden interactuar con los micronutrientes Fe, Mn y Cu, lo cual explicaría las tendencias observadas en el presente estudio.

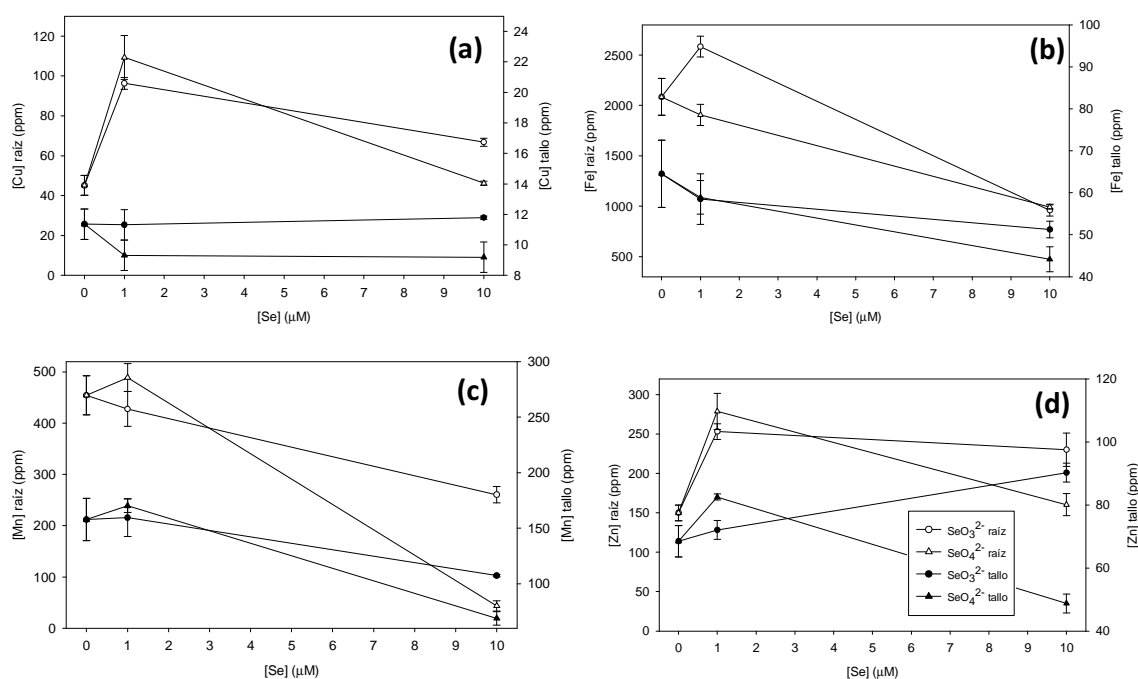


Figura 14. Concentración de micronutrientes en raíces (símbolos abiertos) y tallos (símbolos cerrados) tras 5 días de exposición a selenio en forma de selenito (SeO_3^{2-} , círculos) o selenato (SeO_4^{2-} , triángulos) en presencia de una concentración $2\mu\text{M}$ de Hg.

En términos generales, se puede afirmar que la presencia de selenio a concentraciones de 1 μM en forma tanto de selenito como de selenato, supone una mejora en la absorción nutricional tanto de micro como de macronutrientes en presencia de 2 μM de Hg. Por el contrario, concentraciones superiores de selenio suponen, en la mayoría de los casos, una disminución de absorción de los micro y macronutrientes, lo cual se correlaciona con los efectos fitotóxicos observados en el resto de evaluaciones fisiológicas realizadas.

5. CONCLUSIONES

En lo que se refiere al efecto de distintas concentraciones de mercurio sobre el crecimiento y los parámetros fisiológicos del trigo, se ha determinado un EC_{50} de 2 μM de Hg y se ha demostrado, que el aumento de la concentración de este elemento agrava todos los efectos fitotóxicos estudiados: inhibición de la elongación de las raíces, disminución del peso fresco de raíces y tallos y daños en las membranas celulares vegetales observables mediante tinción vital.

Posteriormente, en los estudios con una concentración fija de mercurio de 2 μM y la presencia de selenio en forma de selenito y selenato, se determinan distintos efectos en función de la especie de selenio empleada como posible fitoremediante.

En el presente trabajo se han estudiado también los efectos en los macro y micronutrientes, observándose que los macronutrientes se acumulan mayormente en los tallos mientras que los micronutrientes lo hacen en las raíces, sin observarse en ningún caso redistribución entre raíces y tallos en comparación con los controles. Lo más destacable de este estudio, es que tan solo el tratamiento con 1 μM de Se como SeO_3^{2-} , daba lugar a claros aumentos de la composición nutricional del trigo, lo cual se correlaciona con los efectos fitoremediantes observados en todos los parámetros estudiados.

En conclusión, de todos los tratamientos estudiados, únicamente el nivel 1 μM Se en forma de SeO_3^{2-} , muestra claros efectos fitoremediantes por sus efectos positivos en los parámetros fisiológicos monitorizados y en la acumulación de selenio y mercurio.

Curiosamente, en presencia de mercurio, la especie de selenio que tiene efectos más tóxicos es el selenato, mientras que en ausencia de mercurio lo era el selenito. Esta inversión de la toxicidad podría ser debida a la formación de un complejo Se-Hg enlazado a proteínas entre el selenito y el mercurio que minimiza los efectos fitotóxicos de este contaminante.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Wang Q, Kim D, Dionysiou DD, Sorial GA, Timberlake D (2004) Sources and remediation for mercury contamination in aquatic systems—a literature review. *Environ Pollut* 131(2):323-336.
2. World Health Organization (1979) Environmental Health criteria 1: Mercury. International programme on chemical safety, Ginebra.
3. Barghigiani C, Ristori T (1995) Preliminary study on mercury uptake by *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) in mining area (Mt. Amiata, Italy). *Bull Environ Contam Toxicol* 54:519-525.
4. Rasmussen P, Mierle G, Nriago JO (1991) The analysis of vegetation for total mercury. *Water Air Soil Pollut* 56:379-390.
5. Özcan MM, Harmankaya M, Gezgin S (2012) Environmental Monitoring and Assessment: Mineral and heavy metal contents of the outer and inner tissues of commonly used fruits. *Environ Monit Assess* 184(1):313-320.
6. Turunen AW, Männistö S, Kiviranta H, Marniemi J, Jula A, Tiittanen P, Suominen-Taipale L, Vartiainen T, Verkasalo PK (2010) Dioxins, polychlorinated biphenyls, methyl mercury and omega-3 polyunsaturated fatty acids as biomarkers of fish consumption. *Eur J Clin Nutr* 64:313–323.
7. García-Esquinas E, Pérez-Gómez B, Fernández MA, Pérez-Meixeira AM, Gil E, de Paz C, Iriso A, Sanz JC, Astray J, Cisneros M, de Santos A, Asensio A, García-Sagredo JM, García JF, Vioque J, Pollán M, López-Abente G, González MJ, Martínez M, Bohigas PA, Pastor R, Aragonés N (2011) Mercury, lead and cadmium in human milk in relation to diet, lifestyle habits and sociodemographic variables in Madrid (Spain). Special Issue in Honour and Remembrance of Dr. Larry Needham. *Chemosphere* 85(2):268–276.
8. Salt DE, Smith RD, Raskin I (1998) Phytoremediation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49:643-668.
9. Slat DE, Blaylock M, Juumar NPBA, Dushenkov V, Ensley BD, Chet I, Raskin I (1995) Phytoremediation: A Novel Strategy for the Removal of Toxic Metals from the Environment Using Plants. *Nat Biotechnol* 13:468-474.
10. Liphadzi MS, Kirkham MB (2005) Phytoremediation of soil contaminated with heavy metals: a technology for rehabilitation of the environment. *S Afr J Bot* 71(1):24-37.
11. Hussein HS, Ruiz ON, Terry N, Daniell H (2007) Phytoremediation of mercury and organomercurials in chloroplast transgenic plants: enhanced root uptake, translocation to shoots, and volatilization. *Environ Sci Technol* 41:8439-8446.
12. Ruiz ON, Hussein HS, Terry N, Daniell N (2003) Phytoremediation of organomercurial compounds via chloroplast genetic engineering. *Plant Physiol* 132(3):1344-1352.
13. Cuvín-Aralar ML, Furness RW (1991) Mercury and Selenium Interaction: A Review. *Ecotoxicol Environ Saf* 21(3):348-364.
14. Parizek J, Ostadalova I (1967) The protective effects of small amounts of selenite in sublimate intoxication. *Experientia* 23:142-143.
15. De Souza MP, Huang CPA, Chee N, Terry N (1999) Rhizosphere bacteria enhance the accumulation of selenium and mercury in wetland plants. *Planta* 209:259-263.
16. Belzile N, Chen YW, Tong J, Gunn JM, Alarie Y, Wu GJ, Appanna V (2004) The antagonistic role of selenium in mercury bioassimilation by aquatic organisms. 7th International Conference on Mercury as a Global Pollutant. *Mat Geoenviron* 51:803–806.
17. Pelletier E (1986) Mercury-Selenium interactions in aquatic organisms: a review. *Mar Environ Res* 18:111-132.
18. Cabanero AI, Madrid Y, Camara C (2004) Selenium and mercury bioaccessibility in fish samples: an in vitro digestion method. *Anal Chim Acta* 526:51-61.

19. Mora MA, Wainwright SE (1998) DDE, Mercury, and Selenium in Biota, Sediments, and Water of the Rio Grande-Rio Bravo Basin, 1965–1995. *Rev Environ Contam T* 158:1-52.
20. Kim EY, Saeki K, Tanabe S, Tanaka H, Tatsukawa R (1996) Specific accumulation of mercury and selenium in seabirds. *Environ Pollut* 94:261-265.
21. Barany E, Bergdahl IA, Bratteby LE, Lundh T, Samuelson G, Skerfving S, Oskarsson A (2003) Mercury and selenium in whole blood and serum in relation to fish consumption and amalgam fillings in adolescents. *J Trace Elem Med Bio* 17:165-170.
22. Gailer J (2002) Review: Reactive selenium metabolites as targets of toxic metals/metalloids in mammals: a molecular toxicological perspective. *Appl Organomet Chem* 16:701-707.
23. Yoneda S, Suzuki KT (1997) Equimolar Hg-Se Complex Binds to Selenoprotein P. *Biochem Biophys Res Commun* 231:7-11.
24. Shanker K, Mishra S, Srivastava S, Srivastava R, Dass S, Prakash S, Srivastava MM (1996) Study of mercury-selenium (Hg-Se) interactions and their impact on Hg uptake by the radish (*Raphanus sativus*) plant. *Food Chem Toxicol* 34:883-886.
25. Mounicou S, Shah M, Meija J, Caruso JA, Vonderheide AP, Shann J (2006) Localization and speciation of selenium and mercury in *Brassica juncea* - implications for Se-Hg antagonism. *J Anal At Spectrom* 21:404-412.
26. Yathavakilla SKV, Caruso JA (2007) A study of Se-Hg antagonism in Glycine max (soybean) roots by size exclusion and reversed phase HPLC-ICPMS. *Anal Bioanal Chem* 389:715-723.
27. Shiyab S, Chen J, Han FX, Monts DL, Matta FB, Gu M, Su Y, Masad MA (2009) Mercury-Induced Oxidative Stress in Indian Mustard (*Brassica juncea* L.). *Inc. Environ Toxicol* 24:462-471.
28. Moreno-Jiménez E, Esteban E, Carpena-Ruiz RO, Peñalosa JM (2009) Arsenic and mercury-induced phytotoxicity in the Mediterranean shrubs *Pistacia lentiscus* and *Tamarix gallica* grown in hydroponic culture. *Ecotoxicol Environ Saf* 72:1781-1789.
29. Greger M, Wang Y, Neuschütz C (2005) Absence of Hg transpiration by shoot after Hg uptake by roots of six terrestrial plant species. *Environ Poll* 134:201-208.
30. Sobrino-Plata J, Ortega-Villasante S, Flores-Caceres ML, Escobar C, Del Campo FF, Hernandez LE (2009) Differential alterations of antioxidant defenses as bioindicators of mercury and cadmium toxicity in alfalfa. *Chemosphere* 77:946-954.
31. Zhou ZS, Huang SQ, Guo K, Mehta SK, Zhang PC, Yang ZM (2007) Metabolic adaptations to mercury-induced oxidative stress in roots of *Medicago sativa* L. *J Inorg Biochem* 101:1-9.
32. Koyama M, Toda T, Yokota S, Zuraida D, Hara T (1995) Effects of aluminium and pH on root growth and cell viability in *Arabidopsis thaliana* strain Landsberg in hydroponic culture. *Plant Cell Physiol* 36:201-205.
33. Suzuki A, Miura A, Aoba K (1999) Effects of aluminum, calcium, and phosphate on shoot growth, viability, and aluminum distribution in the root apices in highbush blueberry cultured in vitro. *J Jpn Soc Hortic Sci* 68(5):937-941.
34. Microscopy U – The Source for microscopy education website, [recurso en línea], <http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/fluorescenceintro.html>, [23/07/2012].
35. US EPA – US Environmental Protection Agency (2003) Mercury preservation techniques, [recurso en línea], <http://www.epa.gov/nerlesd1/factsheets/mpt.pdf>, [26/07/2012].
36. Schützendübel A, Polle A (2002) Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J Exp Bot* 53:1351-1365.
37. Ortega-Villasante C, Rellán-Álvarez R, Del Campo FF, Carpena-Ruiz RO, Hernández LE (2005) Cellular damage induced by cadmium and mercury in *Medicago sativa*. *J Exp Bot* 56:2239-2251.

38. Gratão PL, Polle A, Lea PJ, Azevedo RA (2005) Making the life of heavy metalstressed plants a little easier. *Funct Plant Biol* 32:481-494.
39. Hall JL (2000) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot* 53:1-11.
40. Cho U-H, Park J-O (2000) Mercury-induced oxidative stress in tomato seedlings. *Plant Sci* 156:1-9.
41. Scott EA, Joseph AC (2009) The effect of Se antagonism on the metabolic fate of Hg in *Allium fistulosum*. *J Anal At Spectrom* 24:759-766.
42. Hale MG, Griffin GJ (1974) Effect of injury on exudation from immature and mature plant fruits. *Plant Physiol Ann* 53:13.
43. Shanker K, Mishra S, Srivastava S, Srivastava R, Daas S, Prakash S, Srivastava MM (1996) Effect of selenite and selenate on plant uptake and translocation of mercury by tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Soil* 183(2):233-238.
44. Shanker K, Mishra S, Srivastava S, Srivastava R, Daas S, Prakash S, Srivastava MM (1996) Study of Mercury-Selenium (Hg-Se) Interactions and their Impact on Hg Uptake by the Radish (*Raphanus sativus*) *Plant Food Chem Toxicol* 34:883-886.
45. Millis KC (1974) *Thermodynamic Data for inorganic Sulphides, Selenides and Tellurides*. Butterworths, Londres.
46. Millaleo R, Reyes-Díaz M, Ivanonv AG, Mora ML, Alberdi MM (2010) Manganese as essential and toxic element for plants: transport, accumulation and resistance mechanisms. *J Soil Sci Plant Nutr* 10(4):476-494.
47. Broadley MR, White PJ, Hammond JP, Zelko E, Lux A (2007) Zinc in plants. *New Phytol* 173:677-702.
48. Zago P, Oteiza PL (2001) The antioxidant properties of zinc: interactions with iron and antioxidants. *Free Radic Biol Med* 31:266-274.
49. Calgaroto NS, Cargnelutti D, Rossato LV, Farias JG, Nunes ST, Tabaldi LA, Antes FG, Flores EMM, Schetinger MRC, Nicoloso FT (2011) Zinc alleviates mercury-induced oxidative stress in *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. *Biometals* 24:959-971.

CAPÍTULO 3

Estudio de la adsorción y distribución de selenio y mercurio en trigo mediante técnicas de sincrotrón

1. INTRODUCCIÓN	89
1. 1. Historia de la radiación sincrotrón	89
1. 2. Naturaleza de la luz sincrotrón	91
1. 3. Espectroscopia de absorción de rayos X (XAS).....	94
1. 4. <i>Bulk</i> XAS	95
1.4.1. <i>Setup</i>	95
1.4.2. Espectros XAS.....	97
1. 5. μ -XAS imaging	98
1.5.1. <i>Setup</i>	98
1.5.2. Imágenes μ -XAS	98
1. 6. Aplicaciones en muestras biológicas: especiación química	99
2. OBJETIVOS	103
3. EXPERIMENTAL	104
3. 1. Instalaciones sincrotrón.....	104
3. 2. Preparación de las muestras.....	105
3. 3. Análisis XAS	107
3. 4. Análisis μ -XAS imaging	108
3. 5. Tratamiento de resultados XAS.....	109
3. 6. Tratamiento de resultados μ -XAS imaging.....	110
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	112
4. 1. Especiación de selenio en trigo mediante técnicas XAS	112
4.1.1. Compuestos de referencia de selenio.....	112
4.1.2. Validación del análisis de especiación.....	113
4.1.3. Muestras de trigo enriquecidas con selenio	115
4. 2. Distribución de selenio y mercurio por μ -XAS imaging.....	122
5. CONCLUSIONES.....	131
6. BIBLIOGRAFÍA	133

1. INTRODUCCIÓN

A lo largo del presente capítulo se introduce la radiación sincrotrón: su breve historia, la naturaleza de la luz sincrotrón y sus aplicaciones en muestras biológicas. La introducción se centra especialmente en la espectroscopia de absorción de rayos X (XAS, *X-ray Absorption Spectroscopy*), una técnica analítica disponible en todas las instalaciones sincrotrón, dado que supone una contribución muy importante para obtener información de gran interés para la especiación en matrices muy diversas, entre ellas, las biológicas.

Concretamente se ha utilizado la técnica XANES (*X-ray Absorption Near Edge Structure*) para determinar la especiación de selenio en trigo y la técnica μ -XANES *imaging* para el estudio de la distribución de selenio y mercurio. Ambas técnicas se presentarán a continuación describiendo los principios básicos, el *setup* de las instalaciones sincrotrón, la información que nos dan los espectros e imágenes, así como la interpretación de los mismos.

1. 1. Historia de la radiación sincrotrón

Aunque la radiación sincrotrón natural se puede observar en el espacio y es tan antigua como lo son las estrellas, la radiación sincrotrón de longitud de onda corta, generada por electrones en aceleradores circulares, tan solo se remonta al año 1947. Dicha radiación, tiene una corta, pero intensa historia, dada su rápida evolución a pasos agigantados, gracias a los avances de la ciencia y la tecnología de los últimos años.¹

La luz sincrotrón es producida aplicando una aceleración centrípeta a un haz de electrones relativistas, es decir, sometiéndolos a un movimiento circular con velocidad constante. El 24 de abril de 1947,

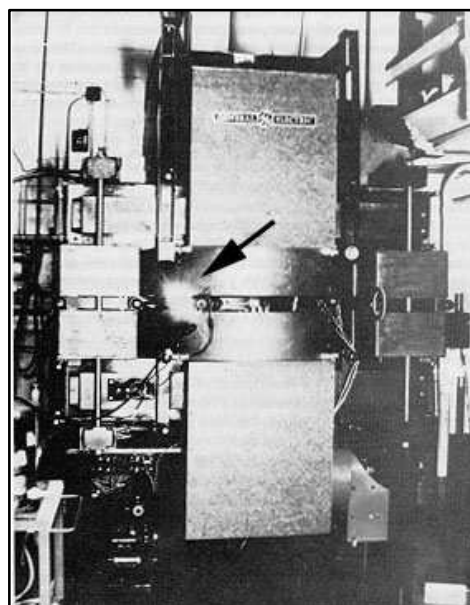


Figura 1. Radiación sincrotrón descubierta en 1947 en el General Electric Research Laboratory.

se descubrió la luz sincrotrón casualmente, cuando un grupo de físicos de partículas del *General Electric Research Laboratory* (Nueva York) trataba de optimizar las condiciones para mantener un paquete de electrones en un acelerador circular de 70 MeV.² Dado que las paredes del acelerador eran de vidrio, permitieron ver la pérdida de energía de las partículas aceleradas en forma de luz visible que atravesaba las mismas (ver Figura 1).³ El experimento propuesto por Edwin McMillan, consistía en sincronizar los electrones de distintas energías para que los más lentos, recibieran más impulso y los más rápidos, menos, formándose de este modo paquetes de electrones. McMillan fue quién bautizó este tipo de acelerador como sincrotrón y a la luz que se producía en él, radiación sincrotrón.^{4,5}

La pérdidas por radiación sincrotrón al acelerar las partículas fueron consideradas durante unos años, un efecto no deseado, hasta que en los años sesenta, algunos científicos decidieron utilizar la radiación sincrotrón para estudios de difracción. Los laboratorios que desarrollaron esta aplicación inicial dieron lugar a lo que se conoce como sincrotrones de primera generación, de los cuales, es necesario destacar, DESY (Hamburgo), SRS (Reino Unido), NBS (Maryland) y SLAC (Stanford).⁶ Entre finales de los 70 y principios de los 90, el uso de la radiación sincrotrón con aplicaciones en distintas disciplinas, se extendió por todo el mundo, apareciendo las primeras instalaciones con dedicación completa a la luz sincrotrón.

Un sincrotrón se basa en el movimiento circular de los electrones, pero la trayectoria en el anillo de almacenamiento no es completamente circular, tiene tramos rectos y curvos, siendo los tramos curvos los lugares donde se produce la luz, porque es donde son acelerados para describir el movimiento circular. Dicha curvatura se consigue mediante campos magnéticos de gran intensidad producidos por imanes de curvatura que son la clave tecnológica de los sincrotrones de segunda generación. En la década de los 90, surgen los sincrotrones de tercera generación que se basan en los

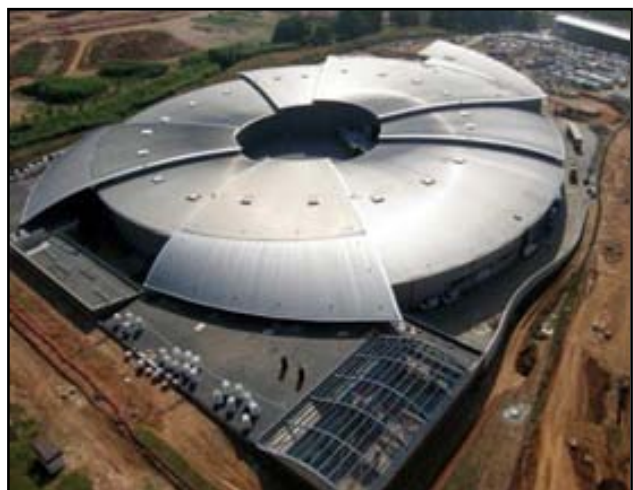


Figura 2. El sincrotrón ALBA (Barcelona), primer sincrotrón de tercera generación de España.

llamados dispositivos de inserción (*wigglers* y onduladores). Estos dispositivos son imanes multipolares colocados en los tramos rectos del anillo que hacen que el haz de electrones tome un movimiento serpenteante y se produzca luz sincrotrón en cada ondulación. De esta manera, aumenta notablemente la intensidad de la radiación sincrotrón. En el apartado de naturaleza de la luz sincrotrón se describirán con más detalle los imanes de curvatura, los *wigglers* y los onduladores. El primer sincrotrón que operó con estos dispositivos fue el ESRF (Grenoble), seguido del APS (Chicago) y el Spring-8 (Japón). Otros sincrotrones a destacar son el ALS (Berkeley), el sincrotrón de Trieste (Italia), el SRRC (Taiwan) y el PLS (Korea). En este apartado, es interesante destacar que el ALBA, es el primer sincrotrón de tercera generación de España y que está en funcionamiento y a disposición de los usuarios desde finales de 2011 (ver Figura 2).⁷

Actualmente ya están en funcionamiento algunos sincrotrones de cuarta generación. Estas instalaciones son fuentes de luz que emiten pulsos con características que permiten el estudio de mecanismos de reacciones químicas a un nivel de detalle sin precedentes. Algunos ejemplos son el FEL y el TESLA de Hamburgo, el SPSS (Chicago) y el LCLS (Stanford).^{8,9}

Los avances en radiación sincrotrón que ha habido a lo largo de la historia y que no cesan en la actualidad, están básicamente relacionados con la mejora del brillo de la luz sincrotrón, es decir, de los fotones por segundo, por unidad de área y por unidad de ángulo sólido para un rango espectral del 0,1% del total.¹ Las mejoras que se consiguen en este sentido, son las que permiten que la información que se pueda obtener en una instalación sincrotrón sea cada vez más valiosa y exclusiva.

1. 2. Naturaleza de la luz sincrotrón

Un sincrotrón es un supermicroscopio de tal potencia, que permite resolver la estructura de la materia a nivel atómico y molecular, lo cual no es fácil con otras técnicas, ya que para estudiar una estructura, se necesita tener luz de una longitud de onda igual o inferior al tamaño de la estructura en estudio. Únicamente los rayos X producidos en una instalación sincrotrón, tienen longitudes de onda similares a las distancias interatómicas de la materia.

En una instalación sincrotrón, los electrones son emitidos por una pistola de electrones y son acelerados en un acelerador lineal (LINAC) para posteriormente, ser dirigidos a un acelerador circular (BOOSTER), donde alcanzan energías del orden de billones de eV. Los

electrones de alta energía se inyectan en el anillo de almacenamiento que se encuentra al vacío y circulan en él a energía constante durante horas. La luz sincrotrón sale tangencialmente del anillo de almacenamiento en distintos puntos para dar lugar a los *beamlines* y las correspondientes estaciones experimentales, donde se utiliza para los distintos fines científicos. Un esquema de lo descrito anteriormente se muestra en la Figura 3.

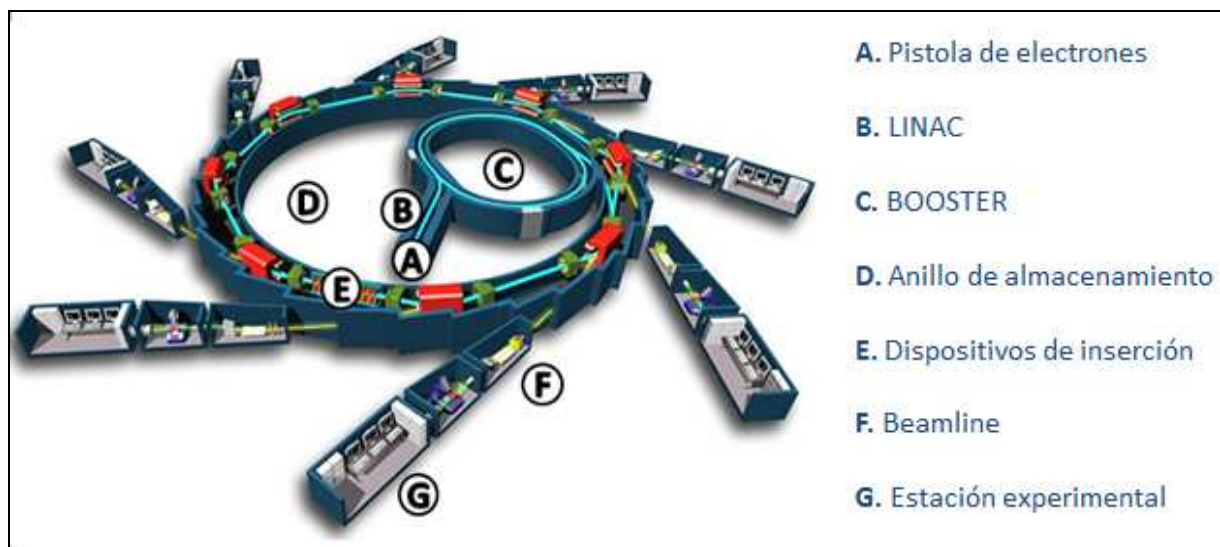


Figura 3. Esquema típico de las partes de un sincrotrón y su funcionamiento.

Como ya se ha comentado en el apartado anterior, en el anillo de almacenamiento hay secciones rectas y curvas. Los electrones que viajan a lo largo del anillo se encuentran con distintos tipos de dispositivos que mejoran las propiedades de la radiación producida.¹⁰ Dichos dispositivos se muestran esquemáticamente en la Figura 3¹¹ y se describen brevemente a continuación:

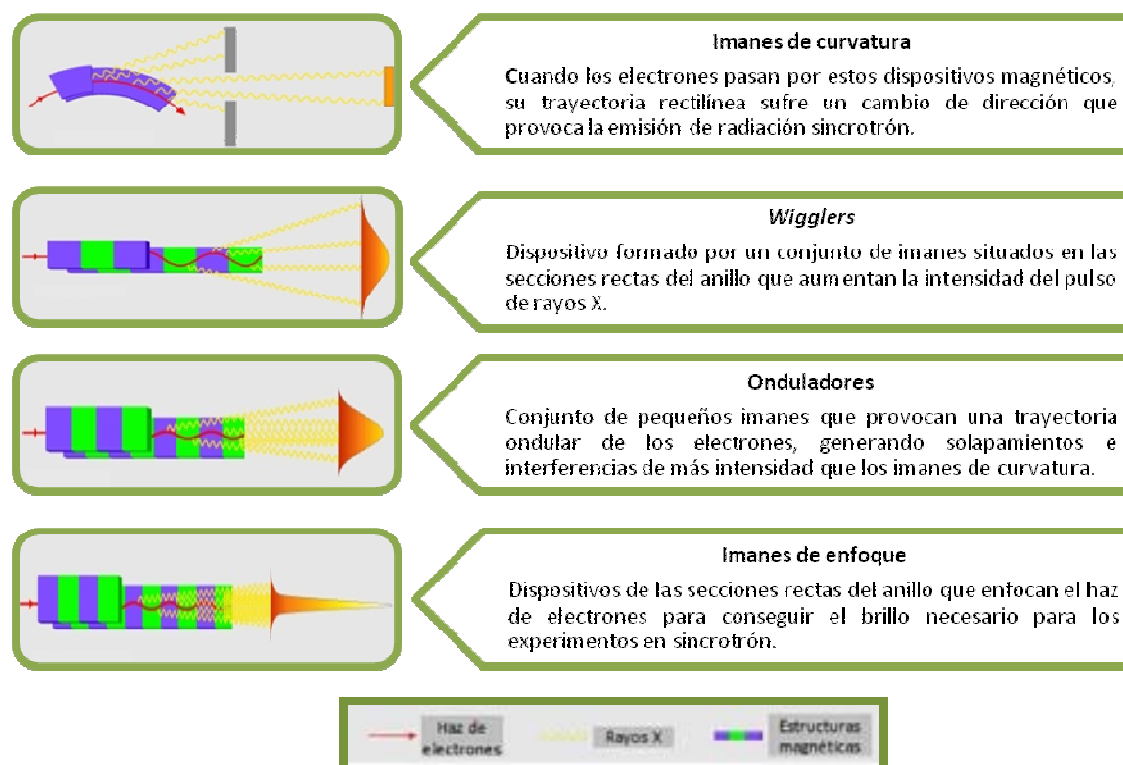


Figura 4. Dispositivos de inserción de una instalación sincrotrón.

Las características más importantes que hacen de la radiación sincrotrón una herramienta única son las que se muestran en la Figura 5.¹²

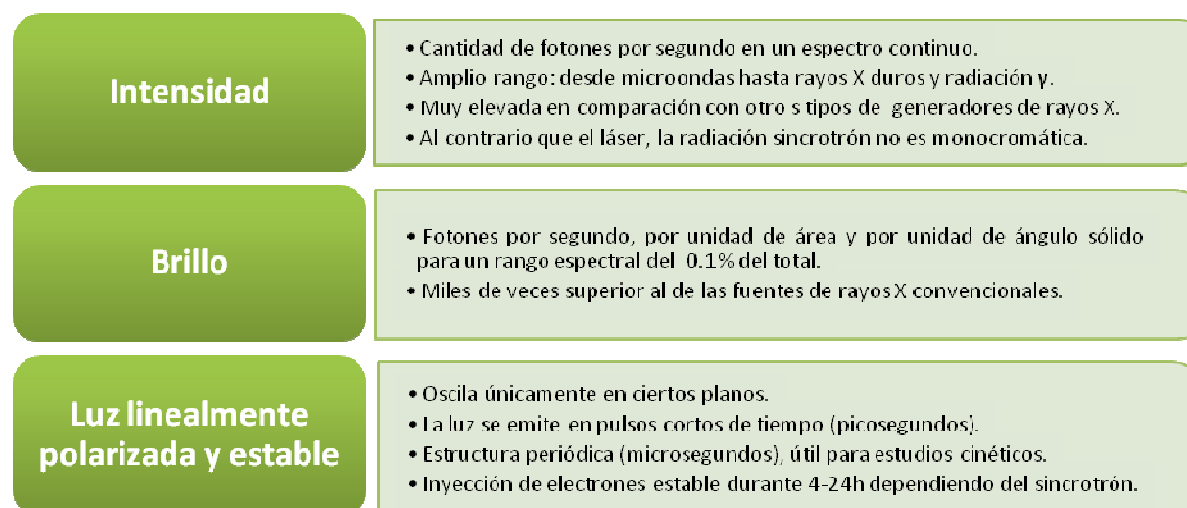


Figura 5. Características excepcionales de la radiación sincrotrón.

Pese a que todas estas características dan un gran potencial a las técnicas sincrotrón, es importante tener en cuenta que también se presentan algunos inconvenientes, como son el limitado número de instalaciones sincrotrón en el mundo y el elevado coste de los ensayos. Adicionalmente, para ciertas aplicaciones, los límites de detección no son los adecuados y el tratamiento de datos puede llegar a ser muy complejo.^{13,14}

1. 3. Espectroscopia de absorción de rayos X (XAS)

Los rayos X interactúan con la materia según distintos tipos de procesos, siendo la absorción para la producción de fotoelectrones, el proceso dominante. Esto hace de la espectroscopia de absorción de rayos X (XAS) una herramienta muy valiosa para el estudio de la estructura local de un elemento en una muestra dada. Es tan sencillo como adaptar la energía de la radiación incidente de los rayos X a la correspondiente para el elemento de interés.

El proceso de absorción de rayos X se caracteriza por tener un umbral de absorción causado por la excitación de un electrón de la capa de valencia hacia capas de mayor energía. Este fenómeno se produce únicamente si la energía de los rayos X incidentes, es igual a la energía necesaria para que se produzca la excitación previamente descrita. La producción de fotoelectrones tras la absorción de rayos X, causa una onda que viaja a través de la materia, la energía de la cual da lugar al característico espectro de transmitancia XAS. Al mismo tiempo, un electrón de capas más altas, cae para rellenar la vacante provocada, emitiendo fluorescencia de una longitud de onda característica del elemento. Debido a que estos dos procesos se producen simultáneamente, los *setups* XAS permiten medir en dos modos: transmitancia y/o fluorescencia.

Fundamentalmente hay dos tipos de medidas XAS:¹⁵

- *Bulk* XAS: un haz de rayos X relativamente amplio interactúa en un punto sobre la totalidad de una muestra homogénea.

- μ -XAS *imaging*: el haz es microscópico e interactúa en toda la superficie de una muestra heterogénea dando lugar a imágenes o mapas de los elementos que la componen.

La técnica con mayor sensibilidad es el *bulk* XAS pero el XAS *imaging* presenta ventajas importantes para la obtención de información acerca de la biodistribución de algunos

elementos en tejidos biológicos intactos. Ejemplos de muestra biológicas que se pueden estudiar con estas técnicas son cultivos celulares, tejidos animales o vegetales e incluso pequeños organismos.

En los apartados que se presentan a continuación, se describirá el *setup* correspondiente a ambas técnicas XAS y se explicará en qué consisten los espectros *bulk* XAS y las imágenes o mapas del μ -XAS *imaging*.

1. 4. Bulk XAS

1.4.1. Setup

En el *beamline* la radiación viaja a través de un sistema óptico formado principalmente por tres partes:

- Rendijas o aperturas: limitan el tamaño del haz evitando la dispersión de energía y mejoran la resolución energética del monocromador.
- Espejos: son los elementos de enfoque y filtrado de la energía incidente.
- Monocromador: permite la selección de la energía de los fotones incidentes. El proceso de monocromador de los rayos X policromáticos incidentes, es esencial para las medidas XAS. Para rayos X de 2 a 10 keV se utiliza un monocromador de doble cristal de Si (111).

Como ya se ha comentado en el apartado anterior, un espectro XAS puede obtenerse en dos modos de trabajo que se detallan a continuación y se esquematizan en la Figura 6:

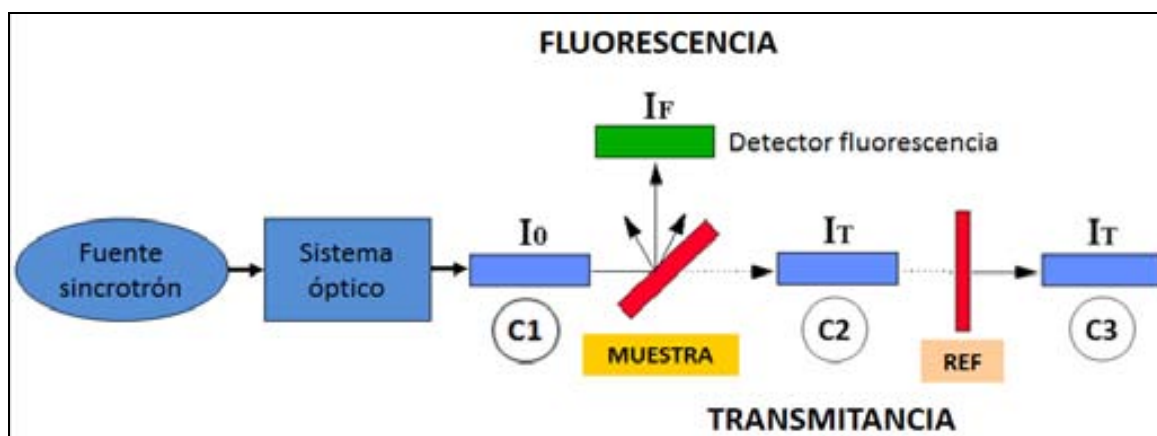


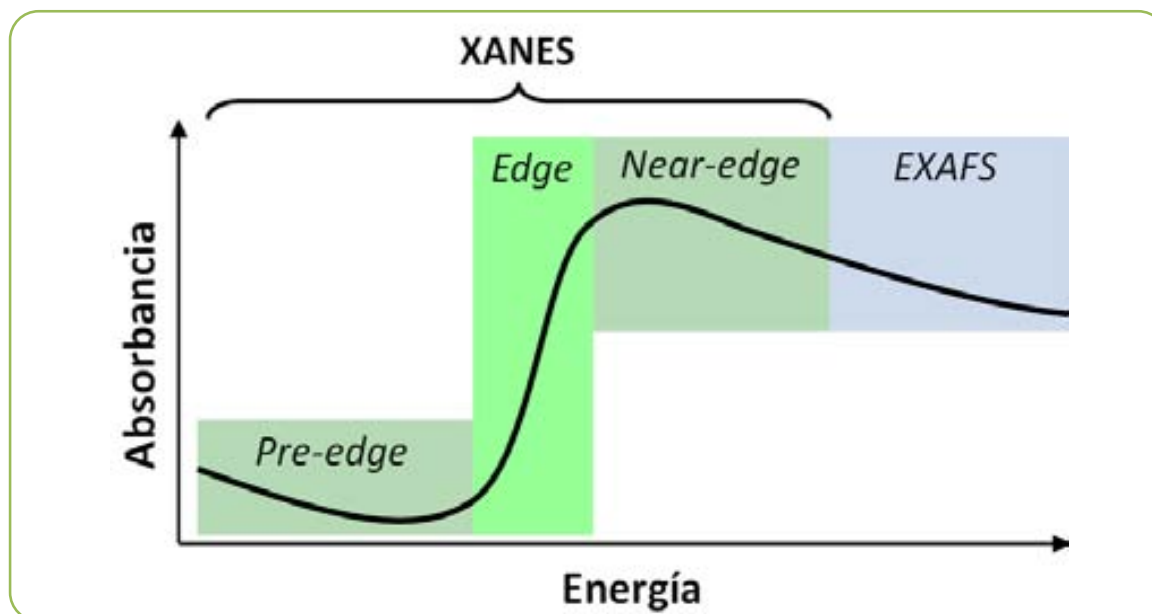
Figura 6. XAS *setup* y sus modos de medida (transmitancia y fluorescencia).

- Transmitancia: la intensidad del haz de rayos X se mide antes (I_0) y después de pasar a través de la muestra (I_T). De esta manera, se cuentan el número de fotones de rayos X absorbidos y se obtiene un espectro XAS que muestra la variación de I_0/I_T frente a la energía. Para medir dicha intensidad se utilizan como detectores, cámaras de ionización rellenas de gas (C1, C2 y C3 en la Figura 6). Entre C1 y C2 se coloca la muestra y se mide la transmitancia a través de la misma. Posteriormente, entre C2 y C3 se coloca una muestra de referencia (REF en la Figura 6) cuyo espectro de transmitancia es conocido y sirve para detectar y corregir en todo momento cualquier variación energética (por ejemplo, una lámina del elemento en estudio puro).

- Fluorescencia: cuando la muestra se encuentra muy diluida y, en consecuencia, la variación de I_0/I_T es pequeña, o bien se conoce que pueden darse fenómenos de autoabsorción por la propia matriz de la muestra, se utiliza el modo de fluorescencia. La radiación fluorescente (I_F) que proviene de la muestra al ser irradiada con rayos X se mide con un detector de germanio (Ge). El detector cuenta el número de fotones emitidos por la muestra y se obtiene un espectro XAS que muestra la variación I_F/I_0 frente a la energía.

1.4.2. Espectros XAS

El espectro de absorción de un elemento se divide en cuatro regiones características descritas y graficadas en el espectro genérico de la Figura 7:



Pre-edge

- Región que está de -2 a -50eV por debajo del *edge*.
- Se trata de una región donde no se da un fenómeno de absorción importante.

Edge

- Se encuentra a -2eV por debajo y -2eV por encima del *edge* de absorción.
- Región donde se observa un aumento pronunciado de la misma

Near-edge

- Región que se encuentra de -2 a -50eV por encima del *edge*.
- Las tres regiones descritas constituyen la zona XANES (*X ray Absorption Near Edge Structure*), que da información acerca de la simetría local del elemento, el estado de oxidación y las distancias y ángulos interatómicos.
- La región XANES es analizada en la presente tesis para la especiación de selenio en trigo.

EXAFS

- La región EXAFS (*Expanded X ray Absorption Fine Structure*) se encuentra de -50 a -1000eV por encima del *edge*.
- El análisis de las oscilaciones de esta región permite obtener información del elemento absorbente y los átomos vecinos (distancias de enlace, número y tipo de vecinos).

Figura 7. Regiones características de un espectro XAS.

1. 5. μ -XAS *imaging*

1.5.1. *Setup*

Las técnicas XAS microscópicas, en comparación con las *bulk*, requieren de un sistema óptico más avanzado porque el tamaño del foco del haz debe ser menor para alcanzar mayor resolución espacial. Mientras que el tamaño del foco en un experimento convencional de *bulk* XAS es de aproximadamente $2 \times 2 \text{ mm}^2$, en un experimento de μ -XAS *imaging*, se pueden alcanzar tamaños de hasta $1 \times 1 \text{ }\mu\text{m}^2$. Los dispositivos más modernos para focalizar el haz son espejos reflectantes, sistemas de espejos en multicapa y lentes de refracción.¹⁶

Como se muestra en la Figura 8, en el *setup* de *imaging*, un motor mueve la muestra en el plano xy para que sea irradiada en su totalidad por los rayos X y escaneada por una cámara CCD. Simultáneamente, en cada uno de los puntos de la muestra, se adquiere la señal fluorescente de los elementos de interés mediante un detector de fluorescencia. El rastreo superficial de la cámara CCD, conjuntamente con la señal de fluorescencia en cada punto (píxel), dan lugar a la imagen μ -XAS con la información acerca de la distribución de los elementos estudiados.

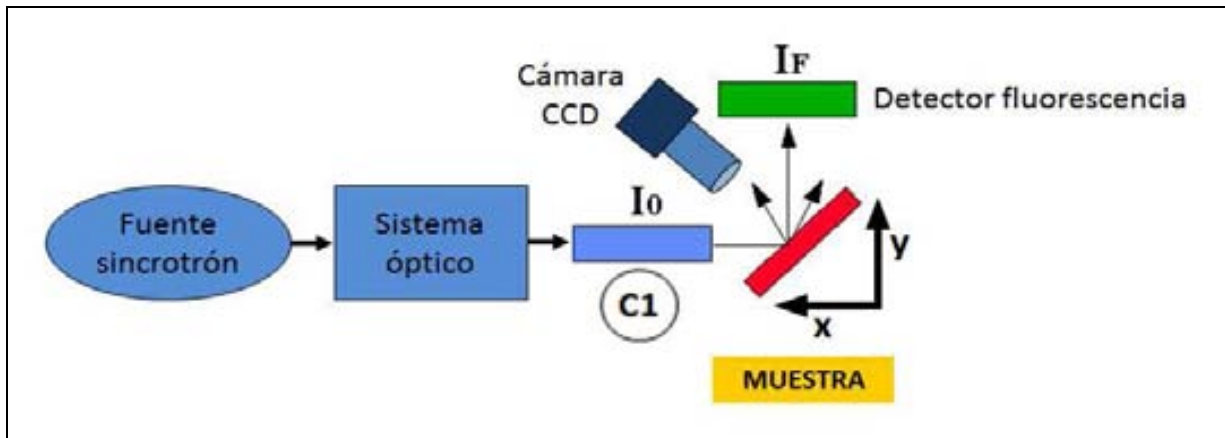


Figura 8. *Setup* μ -XAS *imaging*.

1.5.2. *Imágenes* μ -XAS

Las imágenes que se obtienen en un experimento de XAS dan información acerca de la distribución del elemento en estudio a escala microscópica en la muestra analizada. Dado que simultáneamente, se pueden escanear varios elementos seleccionando las líneas de emisión de

fluorescencia correspondientes a cada uno, también es posible analizar las correlaciones espaciales entre distintos elementos.

1. 6. Aplicaciones en muestras biológicas: especiación química

La IUPAC define la especiación química como la distribución de un elemento en sus especies químicas en un sistema determinado. Paralelamente define una especie química como una forma específica de un elemento definida por su composición isotópica, electrónica, el estado de oxidación o la estructura molecular o de coordinación.¹⁷

La determinación de la concentración total de un elemento no es suficiente para conocer sus propiedades como su movilidad, biodisponibilidad y su actividad en los sistemas ecológicos o en organismos biológicos. El conocimiento de la especiación del sistema es lo que permitirá entender las reacciones químicas y bioquímicas en que se encuentran implicadas las diferentes especies y, de esta manera, conocer las bases de las propiedades indicadas, por ejemplo, se podrá determinar la toxicidad o esencialidad del elemento en estudio. Este es el caso del selenio en los estudios de la presente tesis.¹⁸

Las técnicas XAS permiten el análisis de la especiación química de forma directa sobre las muestras en estudio, en nuestro caso sobre muestras biológicas, es decir, un análisis directo de las especies de un elemento y su distribución en la matriz original sin pretratamiento químico de la muestra en estudio. Al ser técnicas no destructivas de la muestra, cabe esperar que el equilibrio entre especies no se vea afectado durante el análisis.

La absorción de rayos X es una de las técnicas más versátiles basadas en radiación sincrotrón para el estudio de la especiación en muestras biológicas.^{19,20,21} Teniendo en cuenta la flexibilidad experimental descrita en el apartado anterior, no nos debe sorprender la gran cantidad de estudios publicados sobre la aplicación de XAS en muestras relacionadas con la biología y el medio ambiente. Como se ha comentado anteriormente, es posible extraer información acerca de la especiación de un elemento comparando el espectro de una muestra desconocida con los espectros de muestras patrón de las especies en estudio. A este tipo de estudios donde se determinan cualitativamente las especies presentes se les llama con el término inglés *fingerprint studies*. Adicionalmente, existe la posibilidad de llegar a cuantificar la

proporción de las especies presentes en la muestra desconocida. Algunos ejemplos de este tipo de estudios incluyen: análisis de los estados de oxidación del selenio en sedimentos,²² estudio del metabolismo del selenio en *Rhodobacter sphaeroides*,²³ reducción de arsénico en planta de mostaza,²⁴ estado de oxidación del manganeso en suelos,²⁵ magnesio en clorofila A,²⁶ estados de oxidación del hierro en tejidos biológicos,²⁷ absorción de cobre y zinc en *Bradybaena similis*,²⁸ especiación de níquel en especies de *Thlaspi* hiperacumuladoras y no-acumuladoras.²⁹

El μ -XAS *imaging* ayuda a completar los estudios al permitir determinar la distribución espacial elemental en muestras biológicas. Es por ese motivo, que sus aplicaciones han crecido mucho en los últimos años.³⁰ Los mapas elementales que se obtienen se pueden utilizar para caracterizar células, tejidos biológicos o muestras medioambientales que presenten diferentes concentraciones de un determinado elemento. Las técnicas de *imaging* han sido ampliamente utilizadas para determinar los efectos de contaminantes inorgánicos en la biota. La mayor parte de los estudios han sido en material vegetal, mientras que hay menos estudios en invertebrados, anfibios, peces y otras especies animales. Esto es debido a las bajas concentraciones de los elementos en estudio presentes en los niveles más altos de la cadena trófica (biota terrestre) mientras que las plantas y la biota acuática son más fáciles de manipular y presentan niveles de concentración más adecuados.

En el caso de las plantas, se pueden estudiar mecanismos de absorción, toxicidad y tolerancia. Un ejemplo de aplicación de gran interés es conocer el metabolismo de ciertos elementos en plantas hiperacumuladoras para el desarrollo de tecnologías de fitoremediación. Una revisión bibliográfica muy completa acerca de este tipo de estudios fue publicada por Salt et. al. en 2002.³¹ Adicionalmente, proliferan los estudios publicados que determinan los ligandos a que un metal está enlazado^{32,33,34,35,36,37} y la distribución elemental en las dos principales partes de las plantas: las hojas y las raíces.^{38,39,40,41}

En el presente capítulo se mostrarán los resultados de la especiación cuantitativa de selenio en las hojas y raíces del trigo cultivado hidropónicamente. Es importante destacar que, hasta el momento, la gran mayoría de los estudios publicados de especiación de selenio en trigo han sido empleando técnicas de especiación indirectas mediante la separación por

cromatografía líquida (HPLC) acoplada a ICP-MS.⁴² Estos métodos están basados en preparativas de muestra complejas que requieren una extracción eficiente de las especies de interés, un paso experimental crucial que puede potencialmente, alterar la forma química en que el selenio está presente en la muestra. Es por este motivo que en el presente trabajo, se apuesta por las técnicas de especiación directas utilizando instalaciones sincrotrón: XAS y μ -XAS *imaging*.

No son muchos los estudios realizados mediante técnicas basadas en radiación sincrotrón sobre la especiación de selenio en muestras vegetales. En las dos últimas revisiones bibliográficas publicadas al respecto en 2009¹³ y 2011,⁴³ se citan un total de 5 trabajos de especiación de selenio en distintas plantas como *Astragalus bisulcatus*,⁴⁴ *Stanleya pinnata*,⁴⁵ *Convolvulus arvensis*,⁴⁶ cebolla⁴⁷ y arroz,⁴⁸ pero ninguno de los estudios, se centra en la especiación en trigo, siendo la presente tesis, el primer estudio hasta la fecha en este sentido. Es de especial relevancia que, 2 de los 5 trabajos que se acaban de citar, se basan en plantas hiperacumuladoras de selenio (*Astragalus bisulcatus* y *Stanleya pinnata*), lo cual hace que este elemento se encuentre en mayores concentraciones que en las muestras de trigo que en este estudio se analizan. Este aspecto da una complejidad añadida al presente estudio y, en consecuencia, un valor añadido a los resultados obtenidos.

Técnicas de especiación directa como XAS, facilitan información que es de gran utilidad para entender mejor la biodisponibilidad del selenio en una planta como el trigo, la cual genera un gran volumen de producción de alimentos para consumo humano.

Adicionalmente, se han investigado las distribuciones de selenio y mercurio por μ -XAS *imaging* en las hojas y raíces del trigo de los cultivos en presencia de selenio y mercurio para evaluar los posibles efectos del selenio sobre la absorción del mercurio como contaminante, así como las interacciones entre sus respectivas especies. Como ya se ha comentado en el apartado 1.2 del capítulo anterior, así como los estudios en animales en lo que respecta a la evaluación del impacto del selenio en la absorción de mercurio datan de 1967, los estudios en plantas son mucho más recientes, siendo el presente estudio el primero hasta el momento, en que se evalúan los efectos sobre la adsorción del mercurio en plantas de trigo en presencia de selenio.

En resumen, el presente estudio aporta conocimientos y resultados innovadores, respecto a lo publicado hasta el momento, por la relevancia del estudio de los siguientes aspectos:

- Análisis de los efectos fisiológicos en el trigo mediante la actividad físico-química de las especies de selenio implicadas en el enriquecimiento.

- Especiación directa de selenio en las distintas partes del trigo.

- Determinación de la distribución espacial de multielementos (selenio, mercurio, macronutrientes y micronutrientes).

- Determinación de correlaciones espaciales entre los elementos en estudio presentes en las distintas partes de la planta analizada.

2. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta el estado actual de la especiación química en vegetales y en particular de elementos de características contrapuestas como el selenio y el mercurio, la finalidad que queremos alcanzar con el presente estudio incluye dos objetivos bien diferenciados:

1. Especiación de selenio en trigo mediante observación directa por XAS

- Analizar las distintas especies de selenio presentes en plantas de trigo enriquecidas con selenio mediante la técnica de sincrotrón XAS, concretamente estudiando la región XANES.
- Evaluar los efectos de esta biofortificación de trigo con selenio en relación a una posible utilización de los resultados de especiación directa por sincrotrón en aplicaciones prácticas.

2. Estudio de la distribución de selenio y mercurio utilizando μ -XAS *imaging*:

- Análisis de la distribución de selenio y mercurio a niveles traza en raíces y tallos de trigo enriquecido con selenio en presencia de mercurio mediante μ -XAS *imaging*.
- Evaluación de la distribución de selenio y mercurio y de los macronutrientes calcio, potasio y azufre en distintas partes del trigo para revelar posibles efectos beneficiosos de los distintos tratamientos con selenio.
- Estudio de posibles correlaciones en la distribución de los elementos analizados por μ -XAS *imaging* para evaluar posibles interacciones y relaciones metabólicas.

3. EXPERIMENTAL

3. 1. Instalaciones sincrotrón

Los experimentos XAS se han llevado a cabo en tres instalaciones sincrotrón distintas. Concretamente las basadas en *bulk* XAS se realizaron en el ESRF (Grenoble, Francia) y en DESY-HASYLAB (Hamburgo, Alemania) mientras que los experimentos de μ -XAS *imaging* se hicieron en el SSRL (Stanford, EEUU). La Figura 9 muestra esquemáticamente lo explicado anteriormente y los *beamlines* donde se han llevado a cabo los experimentos con su correspondiente imagen.

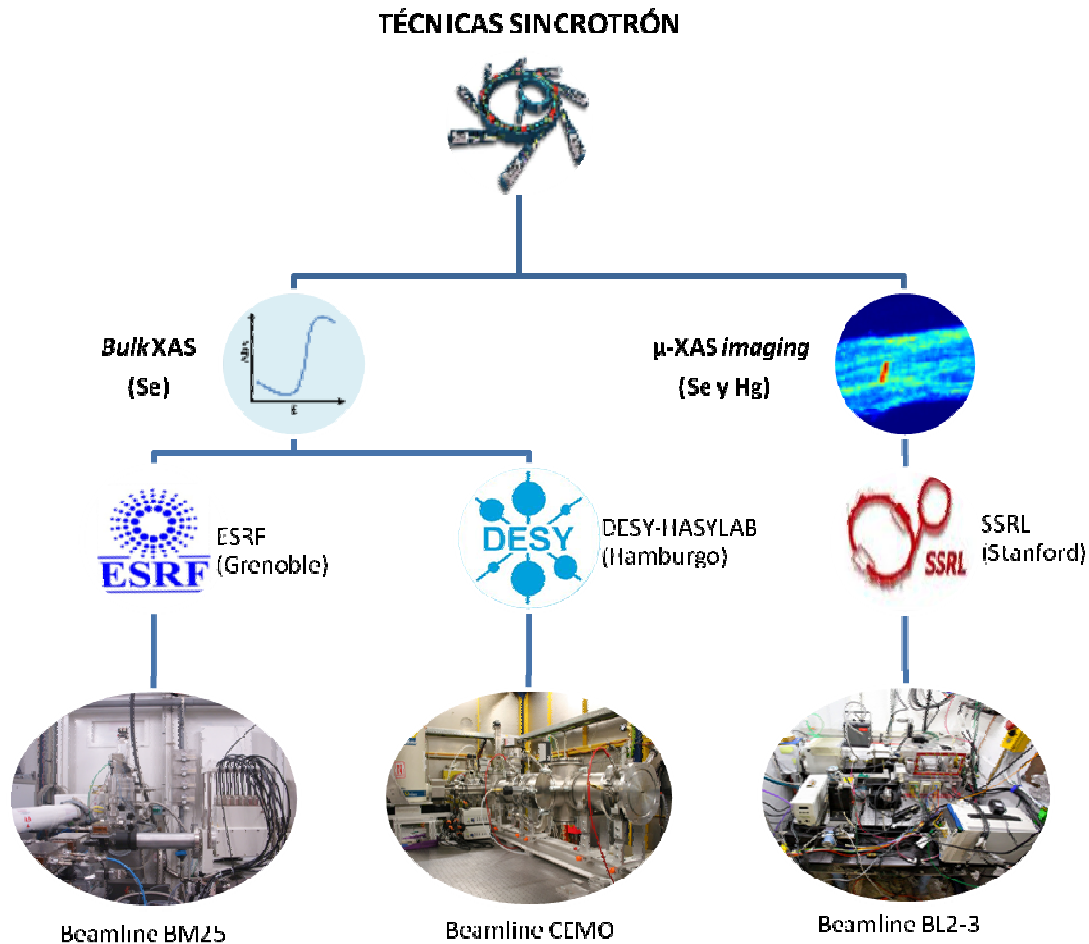


Figura 9. Esquema de las instalaciones sincrotrón donde se han llevado a cabo los experimentos XAS.

Los detalles del *setup* de los *beamlines* de cada una de las instalaciones sincrotrón se especifican en la Tabla 1.

Tabla 1. Características del *setup* de los *beamlines* de cada instalación sincrotrón utilizada.

Instalaciones sincrotrón			
Foto sincrotrón			
Nombre instalación	ESRF	DESY-HASYLAB	SSRL
Beamline	BM25	CEMO	BL2-3
Dispositivo inserción	Ondulador	Imán de curvatura	Imán de curvatura
Energía de la fuente	5-45 keV	5-43 keV	5-24 keV
Corriente máximo	200 mA	140 mA	500 mA
Monocromador	Si (111)	Si (111)	Si(111)
Resolución ($\Delta E/E$)	$\sim 10^{-4}$	$\sim 10^{-4}$	$\sim 10^{-4}$
Flujo de fotones	$\sim 10^{13}$ fotones/s	$\sim 10^9$ fotones/s	$\sim 10^{10}$ fotones/s
Tamaño del foco	2x1 mm	10x1 mm	2x2 μm
Detectores	3 Cl y Si(Li)13	3 Cl y Si(Li)7	Ge3, Vortex y CCD
Ángulo haz-muestra	45°	45°	45°
Temperatura	Temperatura ambiente	Temperatura ambiente	Temperatura ambiente

3. 2. Preparación de las muestras

Para el análisis *bulk* XAS de selenio, las muestras de cada parte del trigo (raíces y tallo) se liofilizan y, bajo congelación con nitrógeno líquido, se molturan finamente en un mortero para prepararlas en forma de pastillas en una prensa hidráulica (Prensa de 25t RIIC, Londres). Dichas pastillas se cubren con cinta adhesiva de Kapton® para conservarlas y mantener su integridad física y química. El Kapton® es una poliimida de alta temperatura y es ampliamente utilizado en la preparativa de muestras para análisis en sincrotrón por sus excelentes propiedades

fisicoquímicas, así como por ser resistente a altas temperaturas, inerte químicamente y altamente resistente a la radiación ionizante.

La preparación de los patrones de cada una de las especies de selenio consiste en diluir y dar consistencia a una cantidad del patrón con polietileno (Sigma Aldrich, Estados Unidos), molturarlo para homogeneizar la mezcla, preparar la pastilla con la prensa hidráulica y cubrirla con Kapton®, de la misma manera que las muestras. Cada pastilla tiene un peso total de 100 mg, de los cuales 20 mg son de patrón y 80 mg de polietileno.

En la Figura 10 se muestran los portamuestras de los *beamlines* del ESRF y del HASYLAB y su lugar de emplazamiento en el *setup*. En el caso del ESRF, se pueden colocar 6 muestras simultáneamente y mediante un motor, se mueve verticalmente el portamuestras para situar la muestra de interés en la trayectoria del haz. El portamuestras del ESRF tiene cabida para 4 muestras y se sujeta sobre una base de un motor que se mueve en xyz para alinear las muestras en la posición de interés.

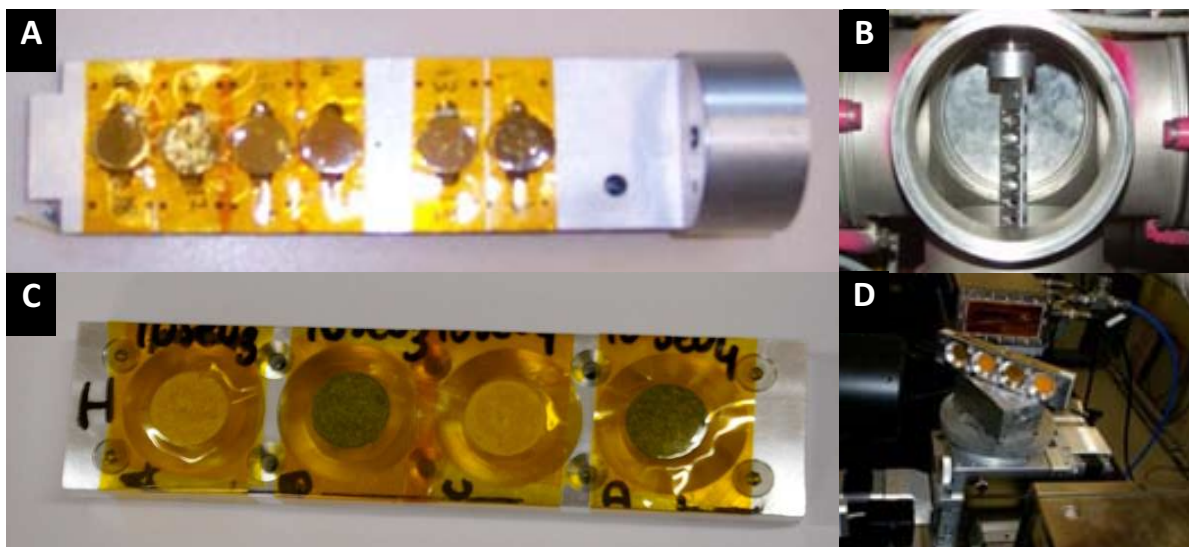


Figura 10. Portamuestras y lugar de emplazamiento en el *setup bulk XAS*. A) Portamuestras para 6 muestras del *beamline* CEMO. B) Portamuestras del CEMO conectado al motor vertical. C) Portamuestras para 4 muestras del *beamline* BM25. D) Portamuestras del BM25 en el motor xyz.

Las especies químicas de selenio estudiadas se dividen en orgánicas o selenoaminoácidos e inorgánicas. Los selenoaminácidos son la selenometionina (SeMet, Across Organics, Bélgica), la selenocistina (SeCy, Sigma Aldrich, Estados Unidos) y la selenometilselenocisteína

(SeMeSeCys, Sigma Aldrich, Estados Unidos). Las especies inorgánicas se basan en las sales sódicas del selenito, SeO_3^{2-} , y selenato, SeO_4^{2-} (Sigma Aldrich, Estados Unidos). En la Figura 11 se muestran las estructuras químicas de todas las especies de selenio estudiadas.

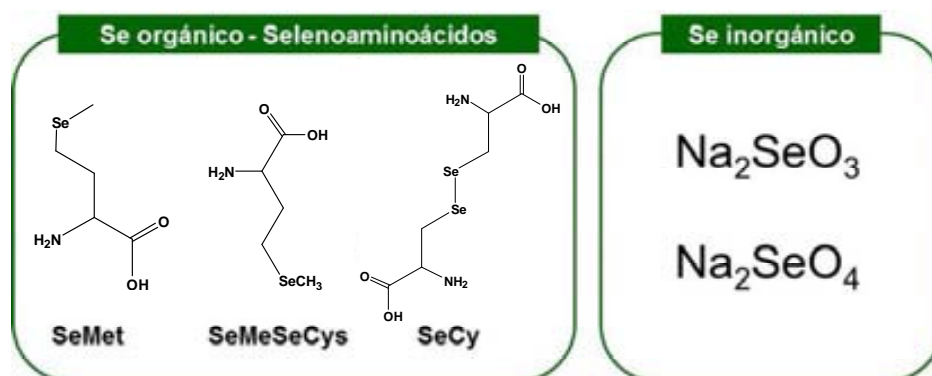


Figura 11. Especies de selenio estudiadas.

La preparativa de muestra para μ -XAS *imaging* consiste sencillamente en conservar las muestras liofilizadas de raíces y tallos intactas para ser escaneadas en el *beamline* y obtener las imágenes de la distribución de los elementos de interés, en este caso, selenio y mercurio.

3. 3. Análisis XAS

Los experimentos *bulk* XAS para el análisis de la especiación de selenio llevados a cabo en los *beamlines* BM25 y CEMO siguen el *setup* teórico descrito en el apartado de la introducción 1.4.1. A modo de ejemplo se muestra una imagen del *setup*, la del BM25 del ESRF (Figura 12), donde se puede diferenciar como están situadas las tres cámaras de ionización respecto a la posición de la muestra y el detector de fluorescencia.

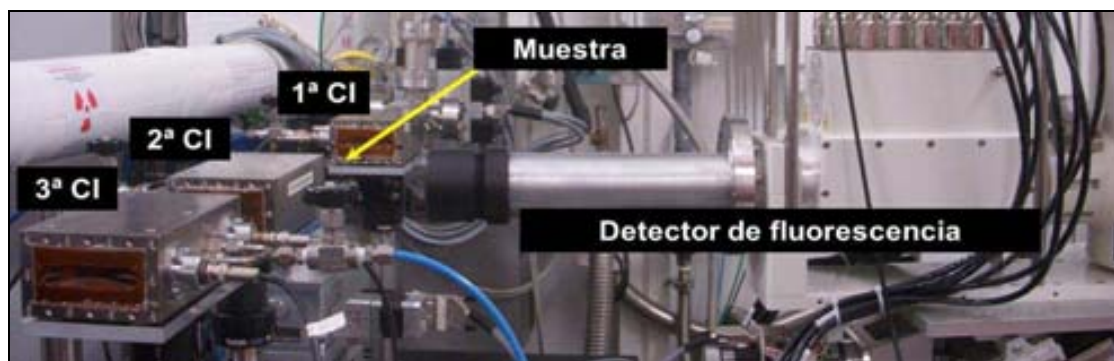


Figura 12. *Setup* para *bulk* XAS del *beamline* BM25 del ESRF (Grenoble).

A nivel técnico-experimental se han detallado todos los parámetros en la Tabla 1 del apartado 3.1. Las únicas diferencias destacables entre ambos *beamlines* son el tamaño del foco y que el detector de fluorescencia es de 7 píxeles en el CEMO y de 13 en el BM25. En ambos casos, se midió la energía de absorción del selenio de su línea K a 12658 eV y sus líneas de fluorescencia $K_{\alpha 1}$ a 11224 eV y $K_{\alpha 2}$ a 12497 eV.

Previamente al análisis XAS, se realiza un espectro de absorción de rayos X de la muestra para determinar el pico de absorción del elemento de interés (intensidad de absorción frente a longitud de onda). Una vez determinadas y eliminadas las posibles interferencias, se ajusta el tamaño de ventana al pico y con estas condiciones, se realiza el espectro de fluorescencia (intensidad de fluorescencia frente a la energía en eV). El sistema realiza el espectro de fluorescencia mediante pasos de energía que se distribuyen según la zona de interés. En XANES estudiamos la zona *pre-edge* y *edge* fundamentalmente, por lo que el número de pasos establecidos en ese intervalo es mayor que en el resto del espectro.

El detector permite registrar tanto la intensidad de fluorescencia como la de transmitancia. En el caso de los patrones, los espectros obtenidos son mucho más limpios porque se trata de muestras puras que presentan una concentración más alta del elemento de interés y los espectros se tratan en modo transmitancia. Se necesitan menos repeticiones y menos tiempo de medida. En las muestras, los espectros presentan más ruido y tanto más, cuanto menor es la concentración del elemento en estudio, por lo que se utiliza la señal de fluorescencia, siendo necesarias más repeticiones y medir durante más tiempo para obtener un espectro más nítido.

3. 4. Análisis μ -XAS *imaging*

El *setup* descrito en el apartado 1.5.1. y detallado gráficamente en la Figura 8 de la introducción del presente capítulo, ha sido el utilizado para el análisis de μ -XAS *imaging*. Concretamente, en la Figura 13 se muestra el *setup* experimental del *beamline* BL 2-3 de energía incidente monocromada a 13keV.

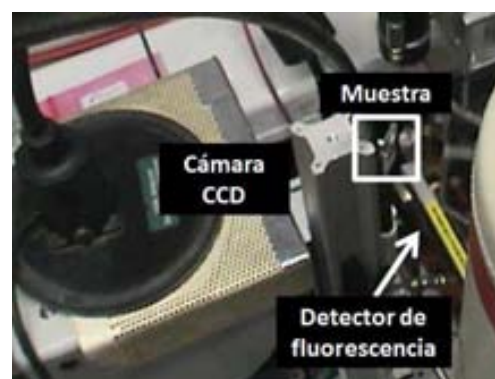


Figura 13. *Setup* para μ -XAS *imaging* del *beamline* BL 2-3 del SSRL (Stanford).

Los mapas de la distribución espacial de cada elemento analizado se adquieren mediante rastreo de toda la superficie de la muestra de raíz o tallo del trigo (ver Figura 14). La superficie total de cada mapa de distribución, que fija el número total de pixels de la imagen que se obtendrá, depende de la superficie de la muestra, adquiriéndose datos de fluorescencia cada $3\ \mu\text{m}$ en un tiempo de adquisición de 50 ms por pixel.

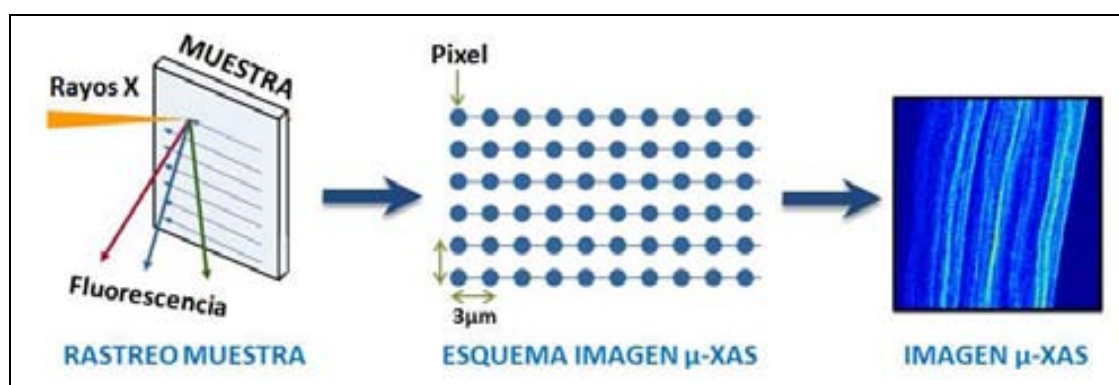


Figura 14. Esquema de la adquisición de una imagen μ -XAS.

Los elementos analizados con esta técnica han sido principalmente selenio y mercurio, pero hay que destacar que adicionalmente, se han monitorizado otros elementos que son de interés a nivel biológico para poder estudiar correlaciones entre ellos, como son los macronutrientes calcio y potasio por ser los más abundantes tanto en raíces como en tallos y el azufre por su analogía con el selenio en la formación de los aminoácidos metionina y cisteína. Estas correlaciones nos permitirán evaluar posibles interacciones en la absorción de los distintos elementos en estudio y posibles relaciones metabólicas.

3. 5. Tratamiento de resultados XAS

Los espectros XAS se analizan con el programa SIXPACK (*Sam's Interface for XAS Package*)⁴⁹, creado por Sam Webb, actualmente el responsable científico del BL2-3 del sincrotrón de Stanford. Concretamente, el tratamiento se limita a la región XANES del espectro que nos da información acerca de la especiación del selenio en las muestras de trigo estudiadas.

Las réplicas de los espectros de cada muestra así como de los patrones se promedian, se normalizan y se corrige la señal de fondo. La especiación cuantitativa de selenio se obtiene mediante análisis de componentes principales (PCA, del inglés *Principal Component Analysis*) y por ajuste de mínimos cuadrados de los espectros de los compuestos de referencia de selenio orgánicos e inorgánicos. Para estudiar la composición de cada muestra como una combinación lineal de los compuestos de referencia, el programa realiza varios ajustes iterativos hasta que no se identifican más componentes significativos y la suma de todos los componentes es igual a $100 \pm 15 \%$, margen de error considerado aceptable debido al error experimental de la técnica para ensayos en muestras medioambientales.⁵⁰ Paralelamente, la bondad del ajuste se cuantifica con el valor del residual, una medida de la desviación de los datos del ajuste (x_{fit}) calculado con respecto a los datos experimentales (x_{data}), que se calcula como se muestra en la Ecuación 1:

$$R = \sum \frac{(x_{fit} - x_{data})^2}{(x_{data})^2} \quad (1)$$

Estadísticamente se consideran ajustes aceptables aquellos en que el valor del residual es inferior a 1, siendo esto indicativo de una desviación mínima entre el ajuste y los datos experimentales.⁵¹ Adicionalmente, la precisión y sensibilidad del ajuste se evalúa mediante el análisis de muestras sintéticas y del material de referencia certificado SELM-1 (*Selenium Enriched Yeast Certified Reference Material*, NRC, Canadá), con una concentración certificada de selenometionina de 3448 ± 146 ppm.

3. 6. Tratamiento de resultados μ -XAS *imaging*

Los resultados de μ -XAS *imaging* se analizan con el programa SMAK (*Sam's Microprobe Analysis Kit*)⁵², creado también por Sam Webb.

Con este programa, se importan los datos de fluorescencia de cada elemento analizado para generar un mapa y ver su distribución en la muestra analizada. También se superponen mapas de distintos elementos para ver distribuciones multielementales y se calculan y grafican correlaciones entre elementos de interés. Las correlaciones entre dos elementos se obtienen por la representación de la intensidad de cada par de elementos en estudio en cada pixel del

mapa. El propio software calcula el coeficiente de determinación (r^2) para determinar el grado de correlación entre los dos elementos en estudio, es decir, la fuerza o magnitud de la relación entre ellos en lo que a distribución en la muestra se refiere. Valores de r^2 cercanos a 1 suponen una correlación lineal positiva mientras que valores cercanos a 0 implican que no hay correlación alguna entre las dos variables en estudio.⁵³ En la Figura 15 se muestra un ejemplo genérico de gráfico de correlación entre dos elementos A y B con distintos grados de correlación lineal.

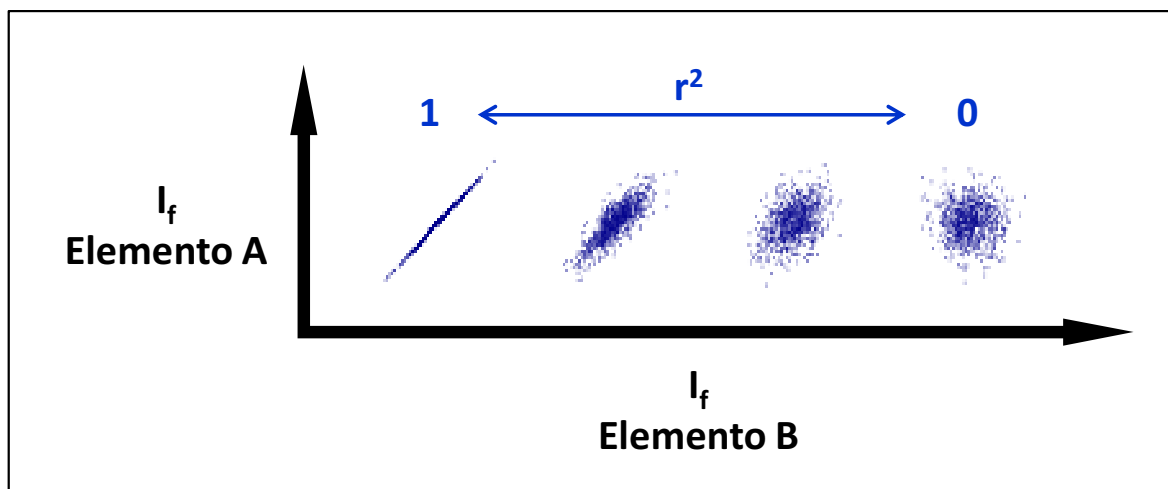


Figura 15. Gráfico genérico de correlación entre dos elementos A y B con distintos grados de correlación lineal.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se recogen los resultados de los estudios realizados para la consecución de los dos objetivos planteados. Así pues, en primer lugar se exponen los resultados correspondientes a la especiación de selenio y a continuación los resultados sobre la distribución de selenio en presencia de mercurio.

4. 1. Especiación de selenio en trigo mediante técnicas XAS

Se presentan aquí los resultados de especiación de selenio en raíces y tallos de trigo obtenidos en los tres tipos de enriquecimiento con selenio, en forma de selenito, selenato y ambas especies en conjunto, a dos niveles de concentración, 1 y 10 μM de Se total.

4.1.1. Compuestos de referencia de selenio

La Figura 16 representa los espectros XANES de selenio para los compuestos de referencia puros estudiados: selenato, selenito, SeCy y SeMet. Como cabe esperar, el salto energético de cada especie se desplaza hacia mayores energías, a medida que el selenio tiene un mayor estado de oxidación.

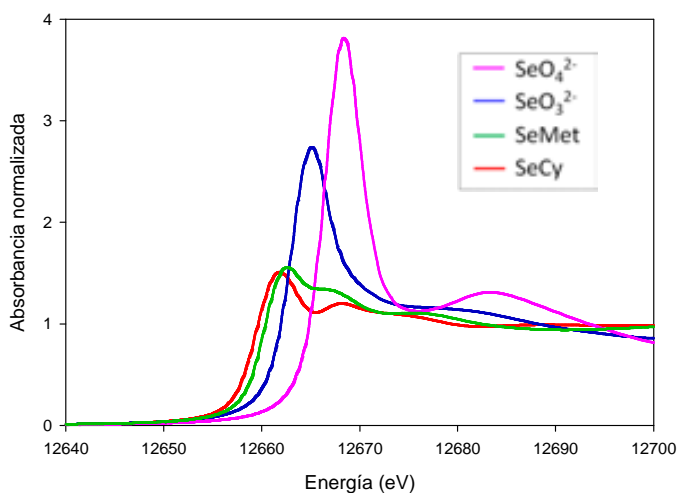


Figura 16. Espectros XANES de selenio de los compuestos de referencia.

Se descarta la especiación de SeMeSeCys ya que no se aprecian diferencias significativas en el *edge* de los espectros de las especies SeMet y SeMeSeCys debido a la gran similitud tanto en su estado de oxidación como en el entorno local del selenio en las estructuras de estos dos selenoaminoácidos ($\text{H}_3\text{CCSeCH}_2\text{R}$) (ver Figura 17). Esta misma similitud ya fue observada por Thavarajah et al. en un estudio de especiación de selenio en lentejas.⁵⁴ Es por este motivo, que en el presente estudio el selenio orgánico se basará en las especies SeMet y SeCy, ambas consideradas las especies de selenio más abundantes en el trigo enriquecido hidropónicamente, lo cual también aplica a la selección de SeMet frente a SeMeSeCys por su similitud espectral.⁵⁵

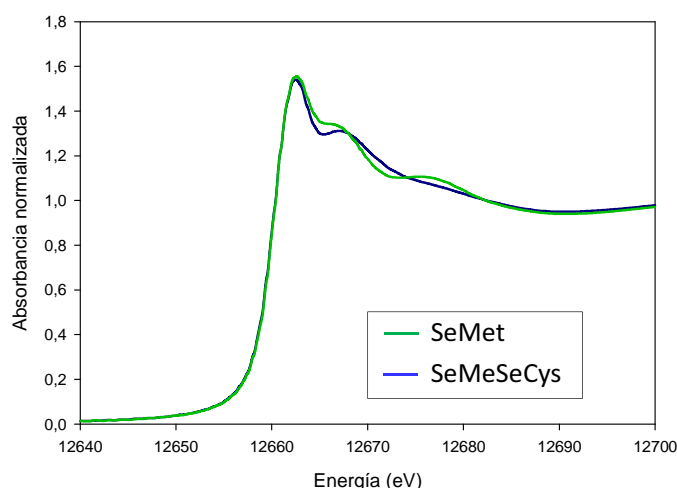


Figura 17. Espectros XANES de selenio de los selenoaminoácidos SeMet y SeMeSeCys.

4.1.2. Validación del análisis de especiación

Para llevar a cabo la validación del tratamiento de datos sincrotrón, se evaluó el material de referencia certificado SELM-1 y las muestras sintéticas.

El espectro XANES del compuesto de referencia certificado SELM-1 se muestra en la Figura 18 (línea sólida) junto con su ajuste lineal (línea discontinua). Para validar el tratamiento de datos, se aplicó el mismo procedimiento de análisis de datos que para las muestras de trigo, obteniendo como resultado, que el material SELM-1 tiene un 100 % de SeMet con un residual del 0,07 %, como era de esperar, ya que este material tiene únicamente selenio en forma de SeMet. De este modo, se valida la exactitud y sensibilidad del método.

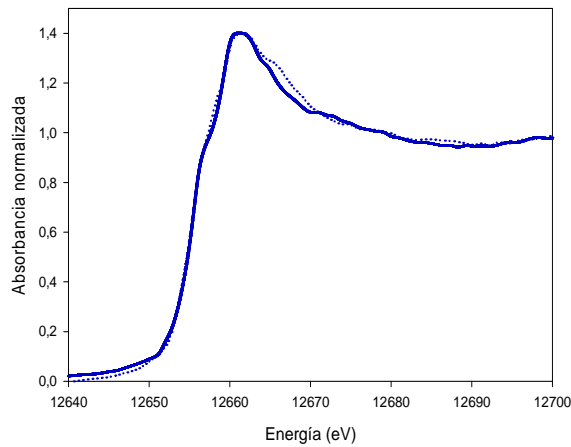


Figura 18. Espectro XANES del CRM SELM-1 (línea continua) y su ajuste lineal (línea discontinua).

Las muestras sintéticas contienen distintas cantidades conocidas de las especies de selenio en estudio y también se analizan para completar la evaluación del método de análisis. En la Figura 19 se muestran los espectros de las muestras sintéticas, una rica en SeMet (A) y otra en SeCy (B), y su correspondiente ajuste con SIXPACK. Es de especial relevancia destacar que el doble pico de absorbancia que se observa en los espectros de las muestras sintéticas es consecuencia de la presencia de las especies de selenio consideradas. Seguidamente, en la Tabla 2 se detallan los resultados cuantitativos de especiación en % de cada especie. Como se puede observar, el ajuste experimental y los resultados cuantitativos de especiación están en concordancia con los valores teóricos.

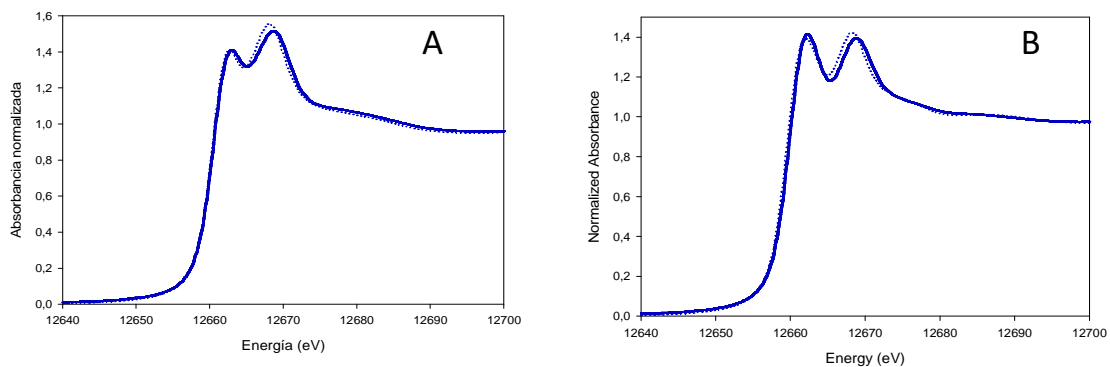


Figura 19. Espectro de las muestras sintéticas (línea continua) y su ajuste (línea discontinua): rica en SeMet (A) y en SeCy (B).

Tabla 2. Resultados cuantitativos de la especiación por ajuste lineal de las muestras sintéticas A y B de la Figura 19. Las composiciones teóricas y experimentales se expresan en %, se detalla el valor del residual de la calidad del ajuste y la suma del porcentaje de todos los componentes de cada muestra.

Compuesto de referencia de Se	Composición teórica (%)	Composición experimental (%)	Residual	Suma de los compuestos (%)
Muestra sintética rica en SeMet (Figura 19.A)				
SeO ₃ ²⁻	10,0	7,0		
SeO ₄ ²⁻	10,0	8,6		
SeMet	70,0	71,6	0,05	99,0
SeCy	10,0	11,8		
Muestra sintética rica en SeCy (Figura 19.B)				
SeO ₃ ²⁻	10,0	7,2		
SeO ₄ ²⁻	10,0	5,4		
SeMet	20,0	27,0	0,07	99,1
SeCy	60,0	59,5		

Para el análisis de todas las muestras y patrones, se adquieren siempre como mínimo, 3 espectros para confirmar la reproducibilidad de las medidas y chequear posibles alteraciones de los estados de oxidación de las especies o degradación de la muestra durante el análisis. En este aspecto, de todas las muestras analizadas, ninguna mostró diferencias significativas en sus espectros replicados, por lo tanto, se puede indicar que las muestras mantienen su integridad físico-química a lo largo del tiempo de preparación, conservación y de medida.

4.1.3. Muestras de trigo enriquecidas con selenio

Las figuras Figura 20, Figura 21 y Figura 22 muestran gráficamente los resultados del ajuste realizado con SIXPACK para calcular la especiación de selenio en las muestras de los cultivos de trigo enriquecidos con selenito (SeO₃²⁻), selenato (SeO₄²⁻) y la mezcla de ambas especies (SeO₃²⁻+SeO₄²⁻), respectivamente. Para cada tipo de cultivo, se muestran los resultados para los tratamientos de las dos concentraciones de selenio estudiadas (1 y 10 µM) en cada una de las partes del trigo (tallo y raíz).

Es especialmente destacable que las bajas concentraciones de selenio, presentes en las muestras en estudio, constituyen un reto para el análisis XAS. Esto se demuestra comparando los espectros de los tratamientos con concentraciones de 1 µM de Se en sus distintas formas, mucho más ruidosos que los de los tratamientos con 10 µM Se. Pese a ello, ambos han podido ser tratados analíticamente con éxito, ajustándose adecuadamente los datos teóricos a los experimentales, como se puede observar gráficamente.

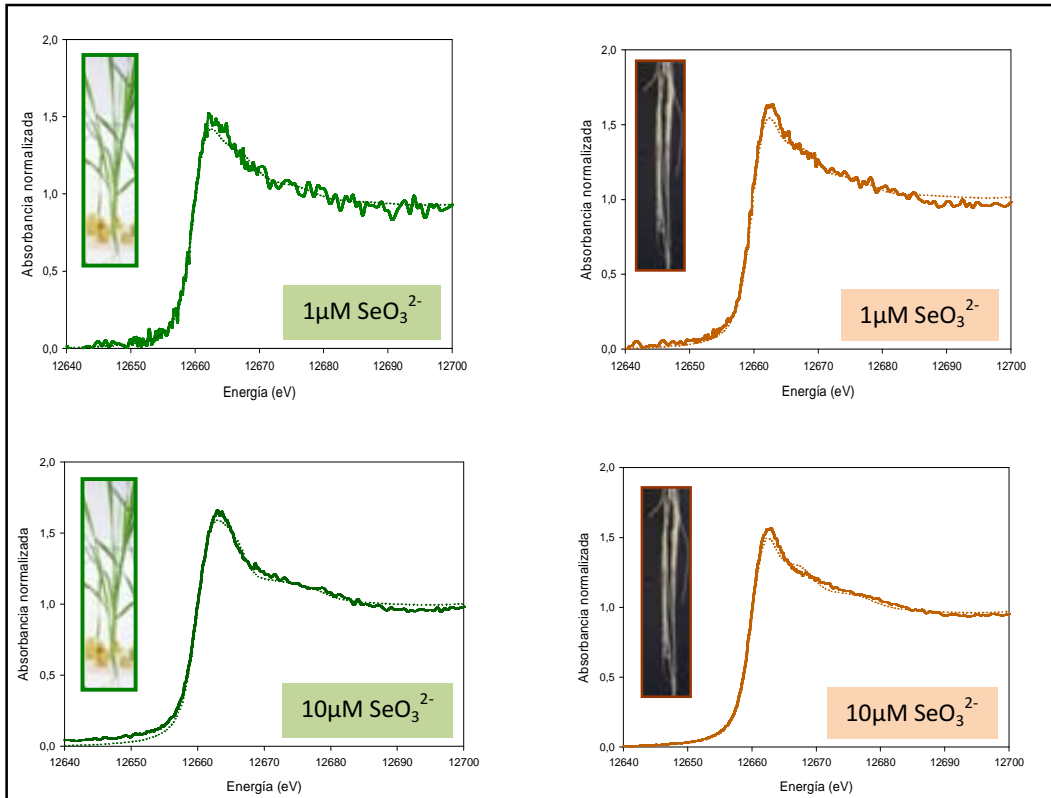


Figura 20. Espectros XANES (línea continua) y su ajuste lineal (línea discontinua) de los tallos y raíces del trigo enriquecido con selenio en forma de selenito (SeO_3^{2-}).

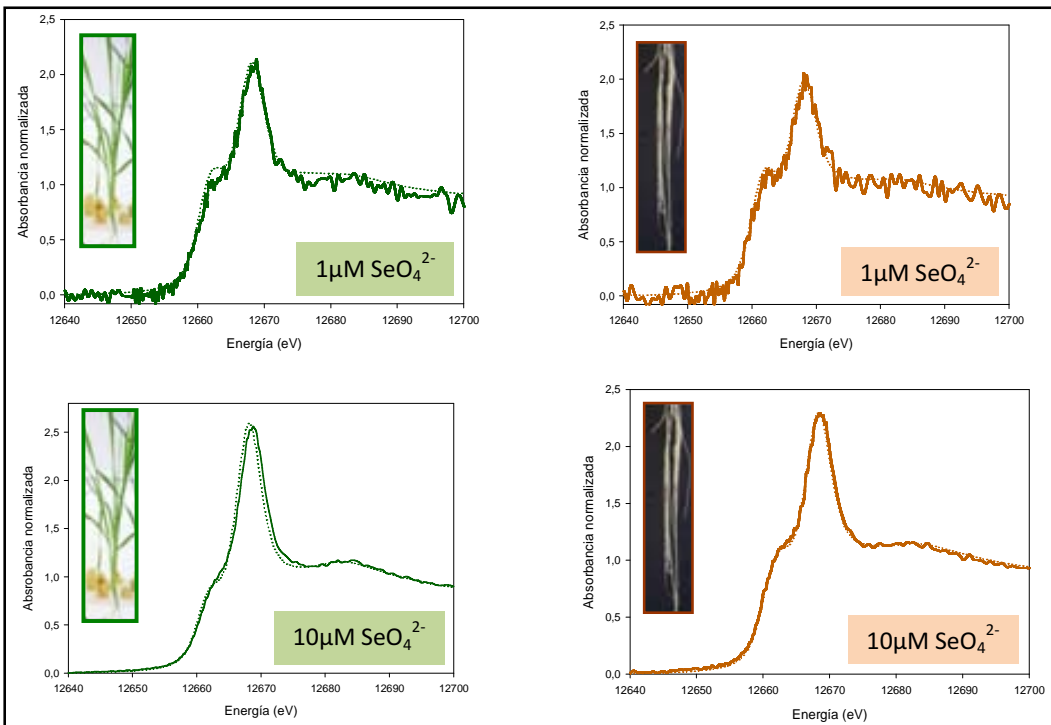


Figura 21. Espectros XANES (línea continua) y su ajuste lineal (línea discontinua) de los tallos y raíces del trigo enriquecido con selenio en forma de selenato (SeO_4^{2-}).

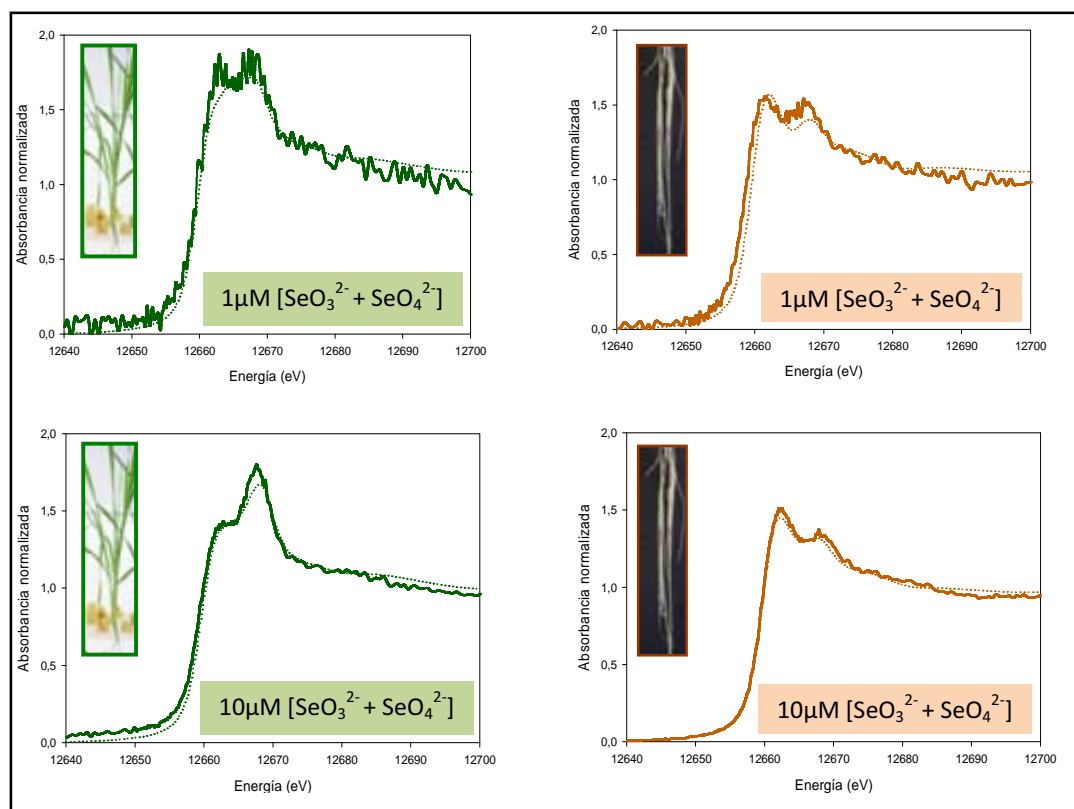


Figura 22. Espectros XANES (línea continua) y su ajuste lineal (línea discontinua) de los tallos y raíces del trigo enriquecido con selenio combinando ambas especies, selenito y selenato ($\text{SeO}_3^{2-} + \text{SeO}_4^{2-}$).

Los resultados cuantitativos de los ajustes de cada tratamiento en las distintas partes del trigo se detallan en la Tabla 3. Con respecto a los tratamientos con selenito, se observa la misma especiación de selenio en raíces y tallos, resultados también publicados por Mounicou et.al. en sus estudios con *Brassica Juncea*, una planta acumuladora enriquecida con selenito.⁵⁶ Como era de esperar, en los enriquecimientos con selenito no se observa selenato en ninguna parte del trigo, esto indica que el selenito absorbido es reducido metabólicamente para formar compuestos orgánicos de selenio como la SeMet y SeCy, siendo el segundo selenoaminácido el más abundante en este caso.

En los tratamientos con selenato, un porcentaje significativo de esta especie no es metabolizado a otras especies y se mantiene como tal (27-50 %). De la parte de selenato asimilada, un pequeño porcentaje finalmente queda como selenito (0,5-4,9 %) mientras que el resto se transforma fácilmente en especies orgánicas. Cuando las plantas absorben el selenato,

previamente a transformarlo a especies orgánicas, el selenato es reducido a selenito, es por este motivo que puede quedar parte del selenio en esta forma aunque no se haya incorporado selenito externamente en el cultivo hidropónico. En referencia a la acumulación de especies orgánicas, para los enriquecimientos con selenito se observa una mayor acumulación de selenio en forma de SeCy, mientras que para los de selenato, el selenoaminoácido mayoritario es la SeMet.

Las condiciones iniciales de las disoluciones de cultivo son distintas en lo que a especiación de selenio se refiere, lo cual implica que los equilibrios químicos de interconversión entre las distintas especies de selenio se vean significativamente afectados. Este es el motivo por el cual se considera lógico que las distribuciones finales de especies orgánicas frente a inorgánicas sean distintas para cada uno de los tratamientos estudiados. Concretamente, en el caso del selenato, en que el camino metabólico es más largo que para el selenito, la acumulación de especies orgánicas es menor porque el equilibrio químico favorece que el selenato se quede en parte como tal (27-50 %) y el resto se transforme en especies orgánicas que interpretamos previo paso por selenito, hecho éste corroborado por un remanente ya indicado (0,5 a 4,9 %) de selenito.

Por otro lado, cabría esperar que, si el selenato al ser asimilado es reducido a selenito, la distribución final de especies orgánicas en las distintas partes del trigo fueran las mismas en ambos tratamientos, es decir, que finalmente el selenoaminoácido más abundante fuera el mismo, mientras que se observa todo lo contrario. En este sentido, hay que destacar el papel que juega el carácter redox de la disolución inicial. Concretamente, la presencia de selenato o selenito en la disolución de cultivo supone una diferencia en el carácter redox del medio, siendo más oxidante un medio enriquecido con selenato en comparación con uno rico en selenito. Esto explicaría que, en los enriquecimientos con selenato, el selenoaminoácido más abundante tanto en tallo como en raíz sea la SeMet, al presentar un estado de oxidación mayor que la SeCy, tal como se mostró en los espectros de la Figura 16. Mientras que, por el contrario, en los enriquecimientos con selenito, el selenoaminoácido más abundante también en ambas partes del trigo estudiadas es la SeCy, al tener el selenito un carácter más reductor.

De esta forma, los resultados obtenidos han puesto de manifiesto una relación clara entre la composición de selenoaminoácidos en la planta y la composición de la disolución de cultivo hidropónico en selenio inorgánico, composición que regula las condiciones redox del medio. Dicha relación revela la funcionalidad entre las propiedades redox de dicha solución de cultivo y las proporciones relativas de los selenoaminoácidos producidos. De esta forma se ha establecido la forma de sintonizar químicamente la producción de selenoaminoácidos específicos en las plantas de trigo. Esta sintonización nos permitiría controlar la producción de selenoproteínas en la planta de trigo lo que conllevaría superar la deficiencia de estabilidad y reproducibilidad de dichos cultivos.

Por último, en los tratamientos mixtos en que se combinan de partida tanto selenito como selenato en concentraciones equivalentes, los resultados muestran que la cantidad de selenio inorgánico es mayor en los tallos en comparación con las raíces. Por otro lado, el contenido de selenio orgánico que se acumula en los tallos se presenta principalmente en forma de SeCy, exceptuando el tratamiento con 10 μM , donde se observa un pequeño porcentaje de SeMet (15,3 %). En comparación con los tratamientos con selenato, en que un gran porcentaje de esta especie inorgánica quedaba como tal, la presencia de ambas especies en el medio favorece la formación de especies orgánicas, ya que el selenito presente inicialmente se transforma a especies orgánicas favoreciendo el equilibrio de transformación de selenato a selenito. En este caso, y teniendo en cuenta lo comentado anteriormente acerca del carácter redox inicial del medio, la presencia de ambas especies compensa las condiciones más oxidantes cuando sólo se emplea el selenato. Este hecho explica que bajo estas condiciones menos oxidantes se observe favorecida la especie SeCy.

Tabla 3. Resultados cuantitativos tras el tratamiento de la combinación lineal para la especiación de selenio en las muestras de tallo y raíz del trigo enriquecido con selenito (SeO_3^{2-}), selenato (SeO_4^{2-}) y la mezcla de ambas especies ($\text{SeO}_3^{2-} + \text{SeO}_4^{2-}$). Se presentan los resultados en composición porcentual de cada especie de selenio, la suma de los porcentajes y el valor del residual correspondiente a la bondad del ajuste.

Cultivo	[Se] cultivo	Parte trigo	Composición de cada especie (%)				Suma (%)	Residual
			SeO_3^{2-}	SeO_4^{2-}	SeCy	SeMet		
SeO_3^{2-}	1 μM Se	Tallo	11,3	0,0	60,5	24,5	96,3	0,17
		Raíz	9,7	0,0	70,7	24,1	104,5	0,17
	10 μM Se	Tallo	16,8	0,0	55,8	35,4	108,0	0,16
		Raíz	6,9	0,0	50,8	42,3	100,0	0,07
SeO_4^{2-}	1 μM Se	Tallo	0,0	32,5	5,7	61,9	100,1	0,49
		Raíz	0,0	27,9	15,9	56,2	100,0	0,54
	10 μM Se	Tallo	0,5	50,9	0,0	48,6	100,0	0,21
		Raíz	4,9	38,2	27,9	32,3	103,3	0,07
$\text{SeO}_3^{2-} + \text{SeO}_4^{2-}$	1 μM Se	Tallo	24,9	8,1	81,5	0,0	114,5	0,63
		Raíz	7,5	2,4	98,3	0,0	108,2	0,75
	10 μM Se	Tallo	17,5	12,3	75,4	0,0	105,2	0,32
		Raíz	9,0	2,0	73,6	15,3	99,9	0,08

Los resultados cuantitativos de especiación de selenio muestran que el selenito es transformado más rápidamente a formas orgánicas en las raíces que el selenato, ya que este último tiene una mayor movilidad hacia los tallos como forma inorgánica. Esta observación concuerda con lo referenciado en el apartado 4.2 del Capítulo 1 de la presente tesis acerca de los estudios de McGrath y Fang-Jie Zhao.⁵⁷ Adicionalmente, se detalló en ese mismo apartado que, en los cultivos mixtos, el selenio se acumulaba mayormente en las raíces siguiendo el patrón de distribución de los cultivos con selenito, lo cual podría ser debido a que el selenito frenara el transporte del selenato hacia los tallos. Dicha observación concuerda con los resultados cuantitativos de especiación, ya que los porcentajes de selenato en el cultivo mixto son muy inferiores a los del cultivo en que se aplica el selenato individualmente. También se observa en los resultados de especiación un patrón similar de distribución de especies entre el cultivo con selenito y el cultivo mixto, dado que en ambos se observa una mayor acumulación de SeCy frente a SeMet y porcentajes de selenito en raíces y tallos muy similares.

Finalmente, se presenta un gráfico en la Figura 23, donde se ha calculado el porcentaje de selenio orgánico (suma de SeCy y SeMet) e inorgánico (suma de selenito y selenato). Como se

puede observar las proporciones de selenio inorgánico y orgánico varían en función de la especie de selenio con la que se ha realizado el enriquecimiento hidropónico de la misma.

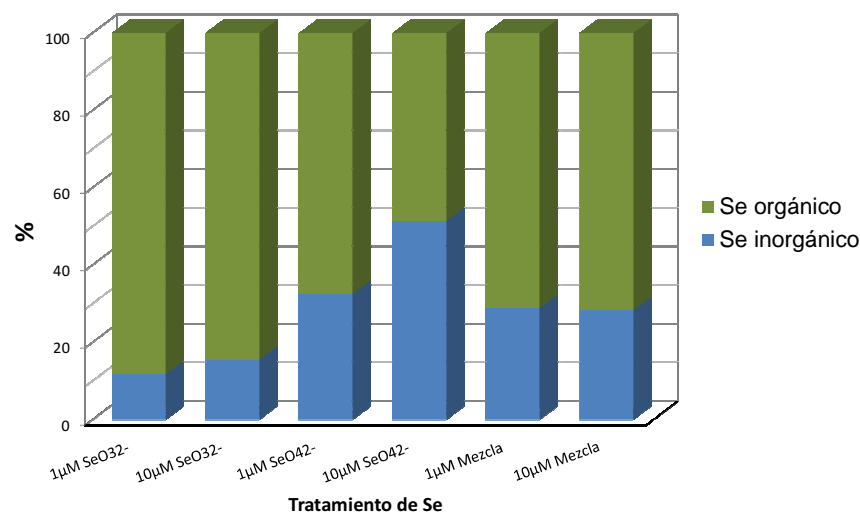


Figura 23. Distribución del selenio orgánico e inorgánico en los tallos normalizada en porcentaje.

En lo que se refiere a la biofortificación con selenio, es de especial importancia destacar, que el objetivo es encontrar un procedimiento de enriquecimiento que acumule selenio principalmente en sus formas orgánicas y concretamente en los tallos del trigo. El selenio debe estar mayormente en forma orgánica, porque son las especies químicas que darán funcionalidad biológica a los productos del trigo, en detrimento de las formas inorgánicas. Por otro lado, los tallos son la parte del trigo de su primera etapa de crecimiento y la parte que determinará el contenido de selenio en el trigo que llegará a fruto para su transformación industrial en los distintos productos enriquecidos y finalmente a los consumidores.

Si se comparan los distintos tratamientos estudiados, los enriquecidos con selenato, dan lugar a un menor contenido de selenio orgánico en los tallos, mientras que los fortificados con selenito acumulan una mayor cantidad. Sin embargo, en los estudios presentados en el apartado 4.2 del capítulo 1, el trigo sometido a tratamientos con selenito presentó claros síntomas de toxicidad debido a una mayor acumulación de selenio en comparación con los enriquecimientos con selenato o con la mezcla de ambas especies. De esta manera, se alcanzan niveles de selenio en los tejidos vegetales en que, pese a que el selenio se encuentre en forma

orgánica, suponen intolerancia fisiológica para el desarrollo normal del crecimiento de la planta.⁵⁸

Los tratamientos con la mezcla de ambas especies, selenito y selenato, muestran una especiación en los tallos principalmente en formas orgánicas, en porcentajes mayores a los tratamientos con selenato y solo ligeramente inferiores a los de selenito. Adicionalmente, se demostró en los estudios del primer capítulo, que las fortificaciones con la mezcla de ambas especies de selenio, atenuaba la toxicidad causada por el selenito aplicado individualmente. Si se comparan los resultados de los dos tratamientos mixtos, ambos dan lugar a una misma distribución porcentual de la especiación de selenio, pero el cultivo que acumula mayor cantidad, es el que parte de una mayor concentración de selenito y selenato (10 μM Se en total), como se mostró en los resultados del capítulo 1 en las determinaciones de selenio total en raíces y tallos. Es lógico esperar que una mayor concentración externa induzca a un mayor enriquecimiento debido a los fenómenos de difusión en solución.

En conclusión, los resultados de la especiación de selenio por sincrotrón, indican que la mezcla de especies inorgánicas y la concentración de las mismas son factores que favorecen la transformación del selenio inorgánico en orgánico y minimizan los riesgos tóxicos de esta fortificación. Sin embargo, hay que destacar la importancia de que en los estudios aquí presentados, el trigo ha sido tratado hidropónicamente y que, en condiciones de cultivo en suelos, el comportamiento de selenio puede ser distinto debido a la presencia de otros compuestos químicos y biológicos y sus posibles interacciones, por lo tanto, serán necesarios estudios en suelos reales para elucidar la respuesta del trigo bajo condiciones reales de cultivo en suelo.

4. 2. Distribución de selenio y mercurio por $\mu\text{-XAS imaging}$

En el presente apartado se muestran los resultados del $\mu\text{-XAS imaging}$ de selenio y mercurio en las raíces y tallos del trigo enriquecido con selenio en presencia de mercurio. Debido a las limitaciones de la técnica en lo que a sensibilidad se refiere, únicamente se pudieron analizar las muestras de los tratamientos enriquecidos con una concentración de selenio de 10 μM en presencia de una concentración de mercurio de 2 μM y el correspondiente

control en que únicamente hay presencia de mercurio. Pese a que a este nivel de concentración de selenio se observaron efectos fitotóxicos, tanto por parte del mercurio como por parte del selenio en todos los tratamientos, las imágenes obtenidas nos facilitan información muy útil para entender como afecta la presencia del selenio a la absorción y distribución de mercurio, siendo unos resultados que complementan los obtenidos en el capítulo anterior.

En primer lugar, se evalúa la presencia y distribución de selenio en raíces y tallos. La Figura 24 muestra las imágenes de distribución elemental (Se y Hg) en base a la señal de fluorescencia, tal que a mayor señal en la escala de color indicada en la figura, mayor concentración de los elementos en las dos partes del trigo analizadas (tallos y raíces).

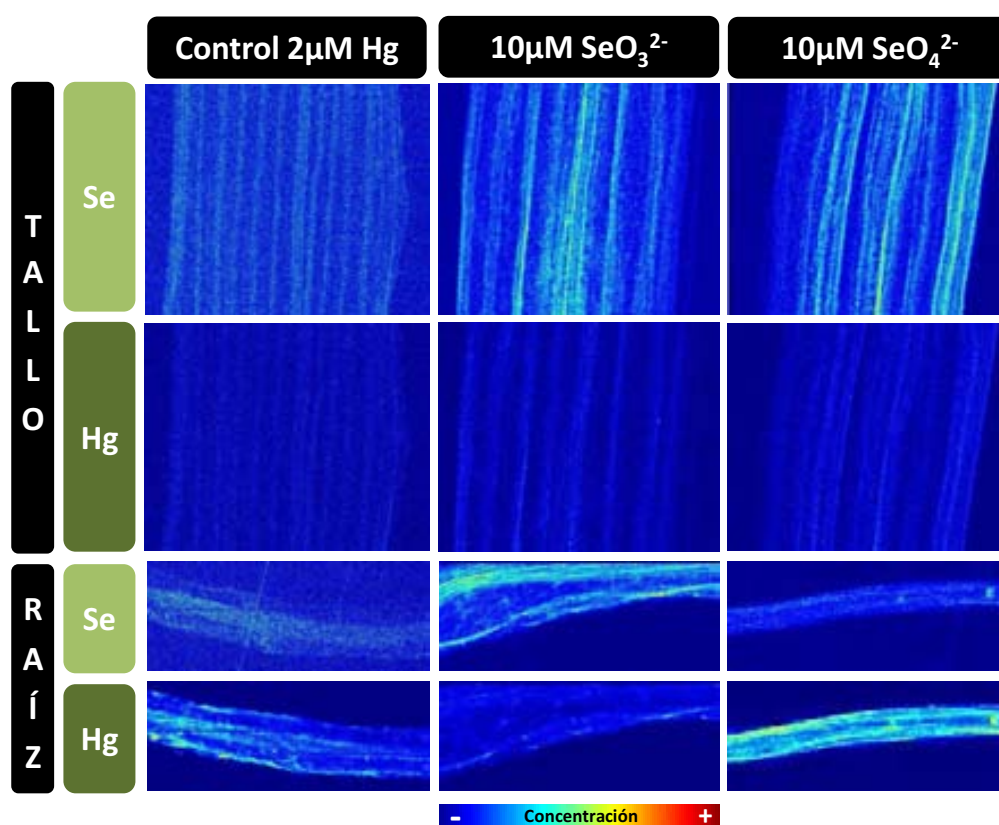


Figura 24. Imágenes μ -XAS de distribución de selenio y mercurio en tallos y raíces de trigo.

La distribución de selenio que se observa en las imágenes concuerda con los resultados graficados en la Figura 12 del capítulo anterior. Si se comparan las raíces de los cultivos con

selenito y selenato, se acumula una mayor cantidad de selenio en las raíces en el cultivo con selenito. En los tallos, en cambio, se observa una acumulación de selenio ligeramente mayor al enriquecer con selenato. Cabe esperar que en el cultivo control no haya señal de selenio, ya que únicamente se ha enriquecido con mercurio, pese a ello, se observa señal para el selenio, aunque ruidosa y poco diferenciable del fondo. Esta señal no deseada, se debe a posibles interferencias que provienen de la intensa señal de fluorescencia de otros elementos presentes en la muestra y de la baja relación señal-ruido al analizar un elemento no presente.⁵⁹

En segundo lugar, se evalúa la presencia y distribución del mercurio como agente fitotóxico. Como se puede observar también en la Figura 24, tanto en el cultivo control, como en los cultivos con selenito y selenato, tan solo una pequeña cantidad del mercurio absorbido es transportado a los tallos, acumulándose mayoritariamente en las raíces, donde se observan diferencias significativas en la concentración acumulada. Concretamente, si se compara con el cultivo control, el tratamiento con selenito supone una disminución de la absorción de mercurio en las raíces. Por el contrario, en el cultivo con selenato, la cantidad de mercurio absorbida aumenta notablemente, hecho que se demuestra por el aumento de la señal de fluorescencia. Estos resultados se encuentran en concordancia con lo estudiado en el capítulo anterior, donde se apreció que la presencia de selenito suponía efectos beneficiosos, mientras que la de selenato, potenciaba los efectos fitotóxicos por la mayor adsorción de mercurio.

Para observar con más claridad el efecto beneficioso del selenito como inhibidor de la absorción de mercurio, se muestran en la Figura 25, imágenes bicolores en que se superponen las señales del selenio, en color verde, y del mercurio, en color rojo. Los tallos tan solo se ven afectados por el mercurio en el cultivo control, acumulándose mucho más selenio en esta parte de la planta al enriquecer tanto con selenito como con selenato. Donde se aprecia más claramente el efecto beneficioso del selenito, es en las imágenes bicolor de las raíces. Así como las raíces del cultivo con selenato muestran una clara acumulación de mercurio al observarse una mayor intensidad del color rojo, en las raíces del cultivo con selenito se observa mayormente un color verde intenso que demuestra la mayor absorción de selenio y la inhibición de la absorción del mercurio como agente fitotóxico. Los resultados se explican por la posible

ocupación del selenio en forma de selenito en las posiciones que podría ocupar el mercurio, lo cual no sucede en el caso del selenato.

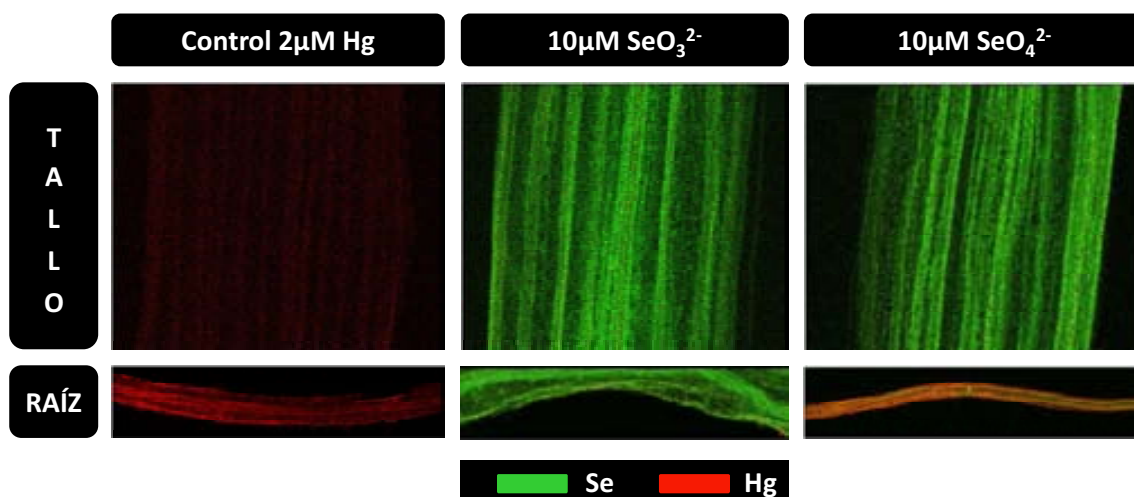


Figura 25. Imágenes bicolor μ -XAS de distribución de selenio (verde) y mercurio (rojo) en tallos y raíces.

Como se ha comentado en la parte experimental, además de los mapas de distribución, se pueden obtener también gráficos de correlación lineal entre parejas de elementos. Concretamente, se ha estudiado la posible correlación entre mercurio y selenio en las raíces del trigo enriquecido. La correlación entre ambos elementos en los tallos, no se realiza debido a la baja acumulación de mercurio. Los gráficos de correlación se presentan en la Figura 26, observándose un grado de correlación significativo que es distinto para las distintas especies de selenio implicadas. Concretamente, la correlación del mercurio con el selenito es mucho más débil que con el selenato, ya que para una misma intensidad de fluorescencia por parte del selenio en cada una de sus especies, la intensidad por parte del mercurio es mucho más elevada en el enriquecimiento con selenato. Este hecho concuerda con lo observado en la distribución de selenio en las raíces de la Figura 25 y los resultados mostrados en el apartado 4.3 del capítulo anterior. Así pues, el mayor grado de correlación entre el mercurio y el selenato es debido a que, en presencia de selenato, se ve favorecida la absorción de mercurio y su fitotoxicidad.

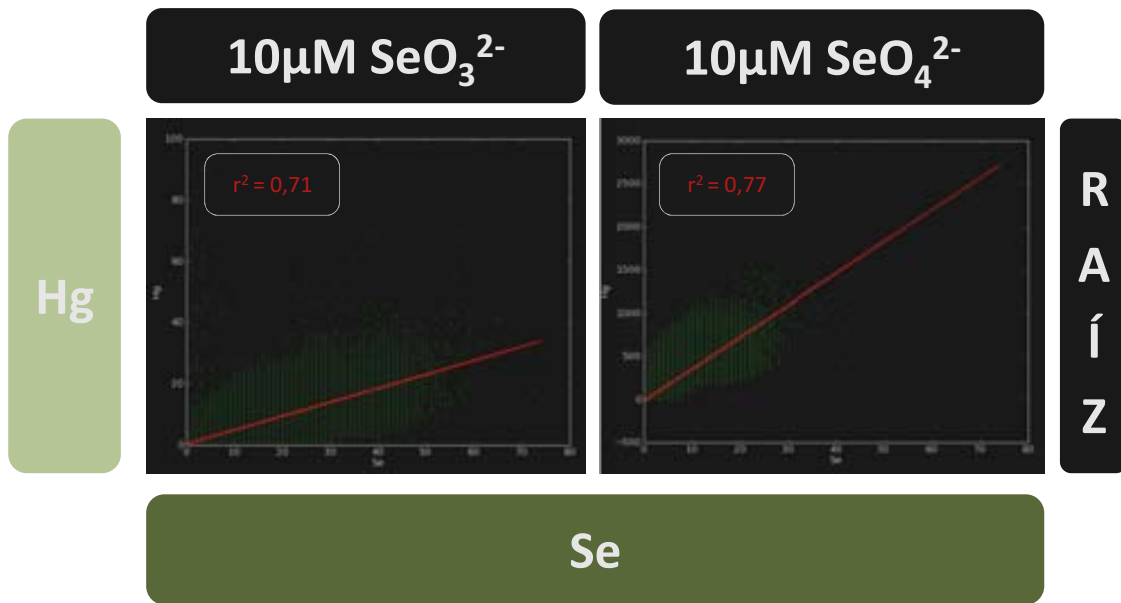


Figura 26. Gráficos de correlación Hg-Se en las raíces.

La distribución de macronutrientes como potasio, calcio y azufre también se ha evaluado por $\mu\text{-XAS imaging}$. En la Figura 27 se presentan los mapas de distribución de estos tres elementos en los tallos y las raíces de las plantas control y las tratadas con selenito y selenato en presencia de mercurio.

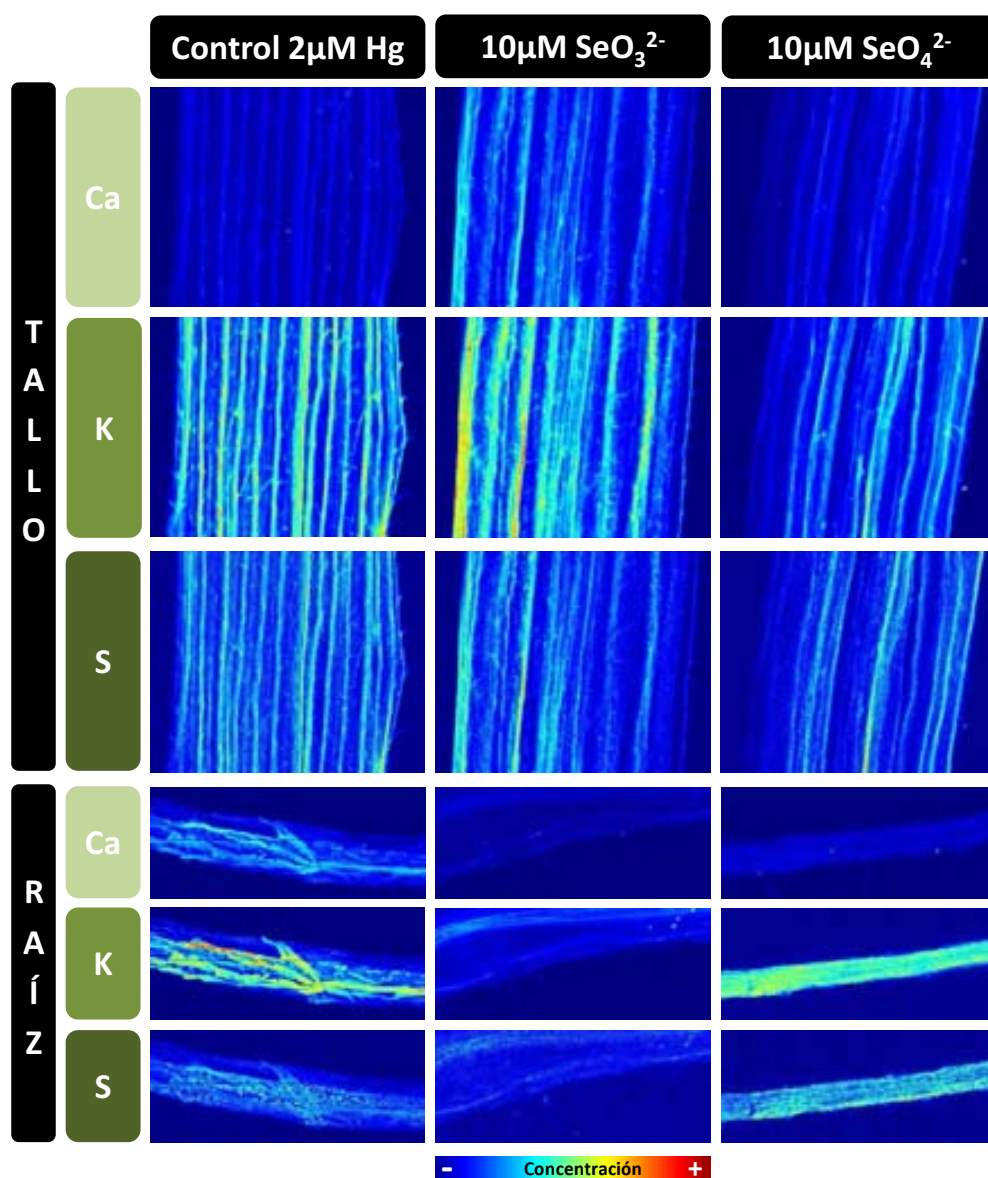


Figura 27. Imágenes μ -XAS de distribución de calcio, potasio y azufre en tallos y raíces de trigo.

En las imágenes de distribución de los macronutrientes analizados en la planta control, se observa que hay una acumulación notable de todos tanto en raíces como en tallos. Al enriquecer con selenito, se observa que se minimiza la presencia de macronutrientes en las raíces y aumenta ligeramente en los tallos. En cambio, la presencia de selenato en el cultivo hidropónico, provoca una acumulación de los macronutrientes en las raíces y una disminución de la translocación hacia los tallos, lo que denota un efecto fitotóxico provocado, muy

probablemente, por la elevada absorción de mercurio en las raíces para este cultivo, lo cual está en concordancia los resultados de la tinción vital

Una correlación de interés en el presente estudio, es la que se observa entre el macronutriente azufre y el selenio. El selenio puede sustituir al azufre en ciertos procesos metabólicos para formar parte de los aminoácidos metionina y cisteína.^{58,60} Los gráficos de correlación S-Se se muestran en la Figura 28. En ellos se observa que la correlación entre estos dos elementos es positiva, pero sin llegar a ser de gran magnitud con valores de r^2 muy inferiores a 1 y distribuciones de los puntos muy dispersas alrededor de la correlación lineal. Esto conduce a concluir que, independientemente de la similitud química en la formación de aminoácidos, estos dos elementos no siguen las mismas vías en lo que a distribución en la planta se refiere.

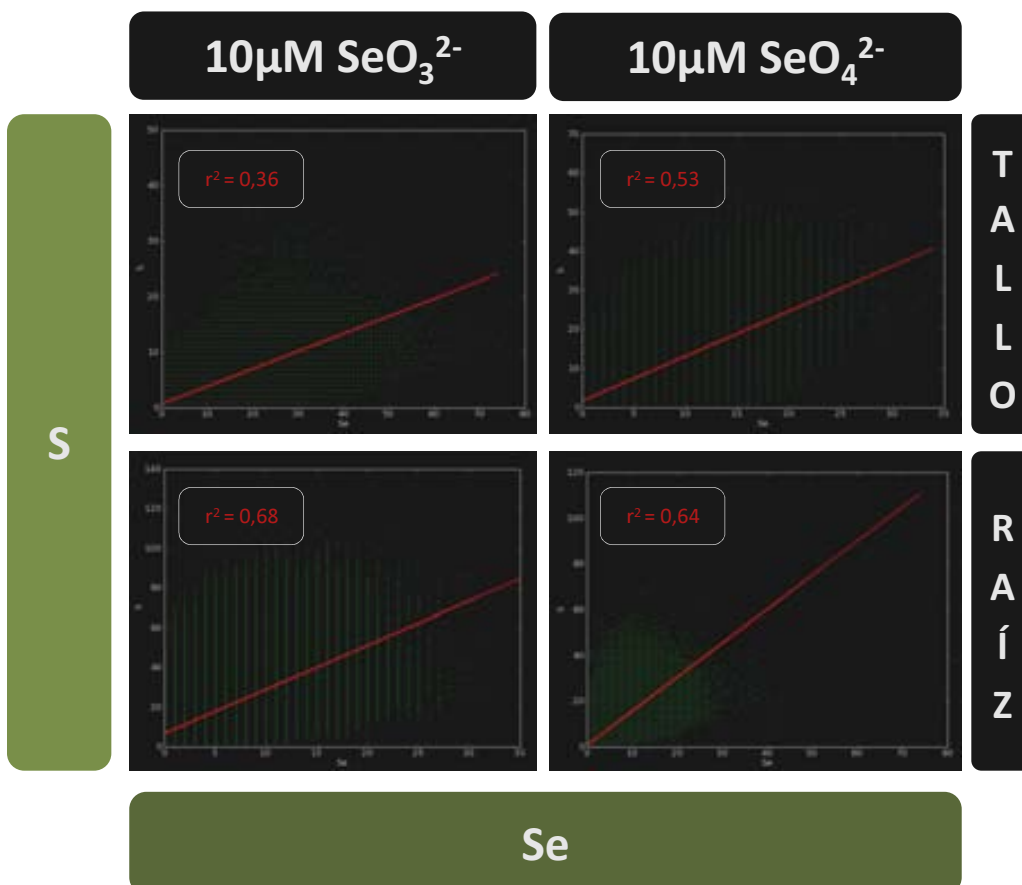


Figura 28. Gráficos de correlación S-Se en tallo y raíz.

Por último, al observarse en todas las imágenes que los tres macronutrientes se distribuyen en el trigo de forma muy similar, se han evaluado las correlaciones lineales entre ellos. En la Figura 29 se presentan los gráficos de correlación del calcio y el azufre frente al potasio, el más abundante.

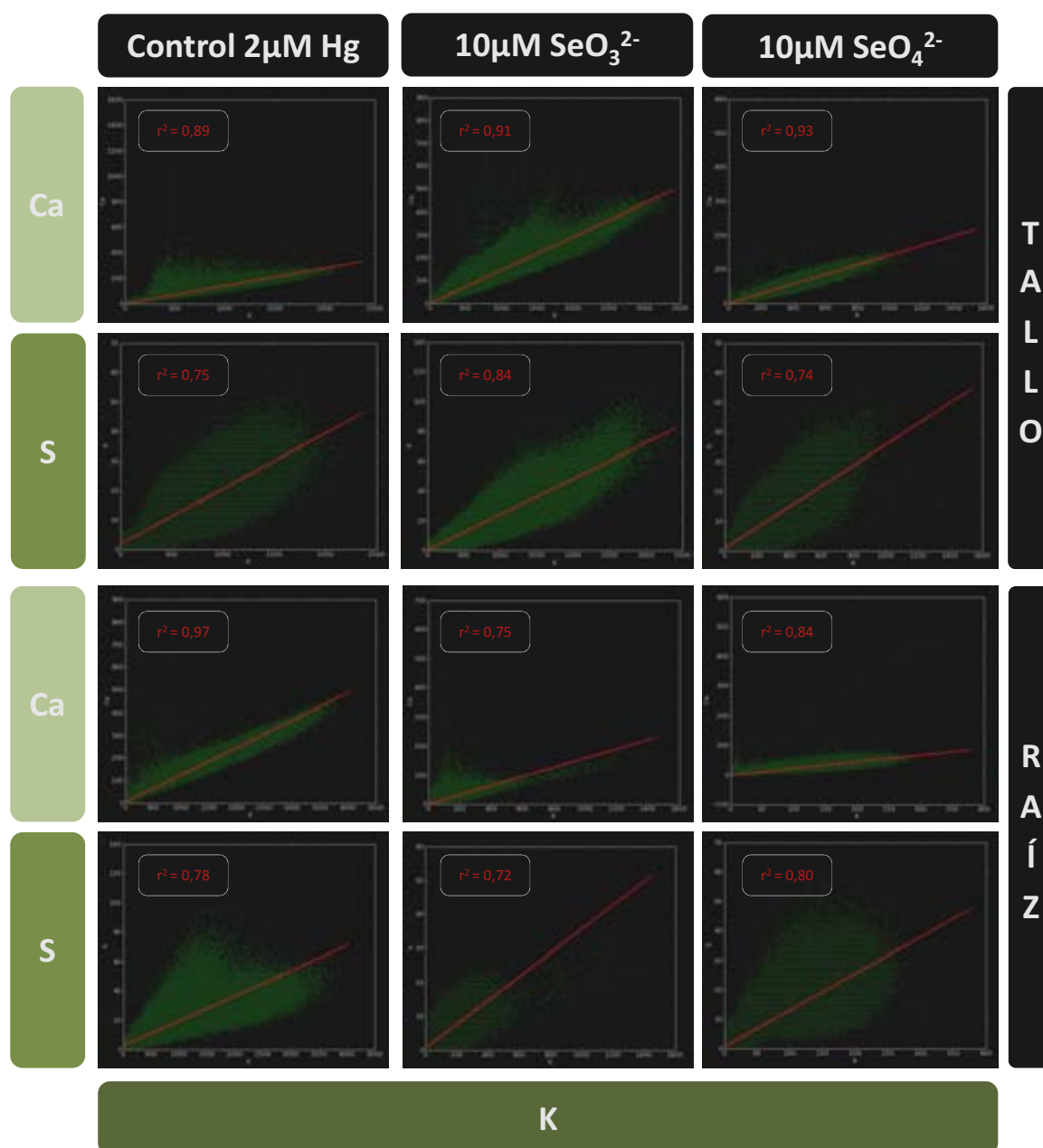


Figura 29. Gráficos de correlación de S y Ca frente a K en tallo y raíz.

En todos los casos (ver Figura 29), se observan correlaciones lineales positivas, con valores de r^2 cercanos a 1 y distribuciones de los puntos lineales alrededor de la regresión trazada, todo ello confirma que estos tres macronutrientes se distribuyen, en mayor o menor medida, de la misma manera en los tallos y raíces.

En los tallos, tanto en los cultivos control como en los enriquecidos con selenito y selenato, las correlaciones son muy similares. Estos resultados concuerdan con lo detallado en la Figura 13 del capítulo anterior, en que no se observaron variaciones significativas en los niveles de concentración de los macronutrientes calcio, azufre y potasio en los tallos del trigo en presencia de selenio y mercurio.

Por el contrario, en las raíces se observan diferencias significativas entre las correlaciones de las plantas control y las de los cultivos con selenito y selenato en presencia de mercurio. De la misma manera que se vió en las imágenes de la Figura 27, la intensidad de la señal de fluorescencia con respecto al control disminuye significativamente para los tres macronutrientes.

En conclusión, las distribuciones en las raíces de los macronutrientes se ven especialmente afectadas por la presencia tanto de las dos especies de selenio como del mercurio, así como no se observan efectos destacables en la distribución de los mismos en los tallos. Adicionalmente, es de especial relevancia destacar que tanto las imágenes de μ -XAS *imaging*, como las correlaciones establecidas a partir de las mismas, son un buen complemento para el estudio directo y no destructivo de muestras vegetales para evaluar la distribución de selenio, mercurio y algunos macronutrientes de interés como el potasio, el calcio y el azufre.

5. CONCLUSIONES

Así como se diferenciaron dos apartados para definir los objetivos, se procede de la misma manera para presentar las conclusiones:

1. Especiación de selenio en trigo por XAS

La observación y tratamiento de los espectros XANES de muestras de plantas de trigo fortificadas con selenio en sus distintas formas, ha permitido determinar cualitativa y cuantitativamente las especies de selenio formadas.

Más concretamente, se han evaluado especies de selenio tanto orgánicas como inorgánicas y se ha validado el método mediante el análisis de un CRM y de muestras sintéticas. Adicionalmente, se han conseguido obtener espectros en muestras con cantidades de selenio muy bajas para la sensibilidad convencional de un equipo de absorción sincrotrón, pudiendo cuantificar adecuadamente todas las muestras analizadas.

Como hecho a destacar, se ha mostrado cómo la variación de las condiciones redox de las especies fortificantes de selenio, determina la proporción entre los correspondientes selenoaminoácidos formados en las partes del trigo analizadas.

Finalmente, en lo que se refiere a la evaluación del tratamiento potencialmente más adecuado para fortificar el trigo con selenio orgánico, se ha determinado que la mezcla de las dos especies de selenio en concentraciones equivalentes, además de atenuar la toxicidad del selenito, es el procedimiento que supone una mayor acumulación de selenio en forma orgánica en los tallos, lo que se atribuye a la variación del potencial redox del sistema. De esta forma, se establece la forma de regular la producción de selenoaminoácidos específicos en las plantas de trigo mediante la sintonización química de las condiciones redox del sistema. Esta sintonización nos permitiría controlar la producción de selenoproteínas en la planta de trigo lo que conllevaría superar la deficiencia de estabilidad y reproducibilidad de dichos cultivos, dándole así a la planta, un valor añadido al ser rica en un elemento vital y esencial.

2. Distribución de selenio y mercurio por μ -XAS *imaging*

En el presente estudio se ha demostrado que el μ -XAS *imaging* es una potente técnica analítica basada en radiación sincrotrón para identificar la localización y distribución en trigo de elementos como el selenio y el mercurio (a niveles traza) y de macronutrientes como calcio, el potasio y el azufre (a concentraciones más elevadas).

Se han confirmado los resultados presentados en el capítulo anterior acerca de los efectos fitoremediantes del selenito al inhibir la absorción de mercurio y potenciar la translocación de macronutrientes a los tallos, mientras que en el cultivo con selenato, se observan efectos totalmente contrarios.

Se han observado correlaciones positivas entre los elementos analizados por observación directa de similitudes en los patrones de distribución en las imágenes μ -XAS y por el cálculo de correlación lineal. Concretamente, hay correlaciones positivas entre el selenio y el mercurio en las raíces de los cultivos con selenito y selenato, entre los tres macronutrientes (Ca, K y S) y tan solo una ligera correlación positiva entre el selenio y el azufre, más marcada para este par de elementos en el caso de las raíces.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Gutiérrez A, Martín-Gago JA, Ferrer S (2004) La luz sincrotrón: una herramienta extraordinaria para la ciencia. *Apuntes de Ciencia y Tecnología* 12: 37-46.
2. Pollock HC (1983) The Discovery of Synchrotron Radiation. *Am J Phys* 51(3):278-280.
3. Thomson A et al. (2009) X-Ray Data Booklet, Berkeley National Laboratory, 3rd edition, Berkeley.
4. McMillan E (1945) The Synchrotron: a proposed high energy particle accelerator. *Phys Rev* 68:143-144.
5. Baldwin GC (1975) Origin of Synchrotron Radiation. *Phys Today* 28(1):9-11.
6. Kulipanov GN, Skrinsky AN (1988) Early Work on Synchrotron Radiation. *Synch Rad News* 1(3):32-33.
7. ALBA Synchrotron Light Facility website, [recurso en línea], www.cells.es, [20/06/2012]
8. Winick H and Doniach S (1980) *Synchrotron Radiation Research*, Plenum Press, Nueva York y Londres.
9. Bernaus A (2005) Application of X-ray Synchrotron Based Techniques to the Study of the Speciation, Sorption and Bioavailability of Hg in Environmental and Biological Systems. Tesis doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona.
10. Winick H, Brown G, Halbach K, Harris J (1981) Synchrotron Radiation: Wiggler and Undulator Magnets. *Phys Tod* 34(5):50-63.
11. DESY-Hasylab Synchrotron Light Facility website, [recurso en línea], http://hasylab.desy.de/facilities/sr_and_fel_basics/index_eng.html, [24/06/2012].
12. Kunz C (1979) *Synchrotron Radiation Techniques and Applications*, Springer-Verlag, Berlin.
13. Lombi E, Susini J (2009) Synchrotron-based techniques for plant and soil Science: opportunities, challenges and future perspectives. *Plant Soil* 320(1):1-35.
14. Lobinski R, Moulin C, Ortega R (2006) Imaging and speciation of trace elements in biological environment. *Biochimie* 88(11):1591-1604.
15. EVISA (European Virtual Institute for Speciation Analysis) website, [recurso en línea], <http://www.speciation.net/Glossary/XAS-imaging-;758>, [20/08/2012].
16. ESRF Synchrotron Light Facility website, [recurso en línea], <http://www.esrf.eu/UsersAndScience/Publications/Highlights/2002/Methods/MET1/>, [11/07/2012].
17. IUPAC (2000) Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000) *Pure Appl Chem* 72(8):1453-1470.
18. Michalke B (2003) Element speciation definitions, analytical methodology and some examples. *Ecotox Environ Safe* 56:122-139
19. Koningsberger DC, Prins R (1988) X-ray Absorption: Principles, Applications, Techniques of EXAFS, SEXAFS and XANES. John Wiley, New York.
20. Schulze DG, Bertsch PM (1995) Synchrotron X-ray techniques in soil, plant, and environmental research. *Adv Agron* 55: 1-66.
21. Yachandra VK (1995) X-ray absorption spectroscopy and applications in structural biology. *Meth Enzymol* 246:638-675.
22. Tokunaga TK, Pickering IJ & Brown Jr. GE (1996) Selenium transformations in ponded sediments. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 60:781-790.

23. Van Fleet-Stalder V, Chasteen TG, Pickering IJ, George GN, Prince RC (2000) Fate of selenate and selenite metabolized by *Rhodobacter sphaeroides*. *Appl Environ Microbiol* 66:4849-4853.
24. Pickering IJ, Prince RC, George MJ, Smith RD, George GN, Salt DE (2000) Reduction and coordination of Arsenic in Indian Mustard. *Plant Physiol* 122:1171-1177.
25. Schulze DG, Sutton SR, Bajt S (1995) Determination of manganese oxidation state in soils using X-ray absorption near-edge structure (XANES) spectroscopy. *Soil Sci Soc Am J* 59:1540-1548.
26. George GN (1993) X-ray absorption spectroscopy of light elements in biological systems. *Curr Opin Struct Biol* 3:780-784.
27. Kwiatek WM, Galka M, Hanson AL, Paluszkiwicz C, Cichocki T (2001) XANES as a tool for iron oxidation state determination in tissues. *J Alloys Compounds* 328:276-282.
28. Yasoshima M, Matsuo M, Kuno A, Takano B (2001) Studies on intake of heavy metals by *Bradybaena similaris*, land snails, by XAFS measurement. *J Synchrotron Radiat* 8:969-971.
29. Krämer U, Pickering IJ, Prince RC, Raskin I, Salt DE (2000) Subcellular localization and speciation of nickel in hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi* species. *Plant Physiol* 122:1343-1353.
30. Westneat MW, Socha JJ, Lee WK (2008) Advances in biological structure, function, and physiology using synchrotron X-Ray imaging. *Annu Rev Physiol* 70:119-142.
31. Salt DE, Prince RC, Pickering IJ (2002) Chemical speciation of accumulated metals in plants: evidence from X-ray absorption spectroscopy. *Microchem J* 71(2-3):255-259.
32. Robinson BH, Lombi E, Zhao FJ, McGrath SP (2003) Uptake and distribution of nickel and other metals in the hyperaccumulator *Berkheya coddii*. *New Phytol* 158(2):279-285.
33. Küpper H, Lombi E, Zhao FJ, Wieshammer G, McGrath SP (2001) Cellular compartmentation of nickel in the hyperaccumulators *Alyssum lesbiacum*, *Alyssum bertolonii* and *Thlaspi goesingense*. *J Exp Bot* 52 (365):2291-2300.
34. Sarret G, Vangronsveld J, Manceau A, Musso M, D'Haen J, Menthonnex JJ, Hazemann JL (2001) Accumulation forms of Zn and Pb in *Phaseolus vulgaris* in the presence and absence of EDTA. *Enviro Sci Technol* 35(13):2854-2859.
35. De la Rosa G, Peralta-Videa JR, Montes M, Parsons JG, Cano-Aguilera I, Gardea-Torresdey JL (2004) Cadmium uptake and translocation in tumbleweed (*Salsola kali*), a potential Cd-hyperaccumulator desert plant species: ICP/OES and XAS studies. *Chemosphere* 55(9):1159-1168.
36. Sarret G, Saumitou-Laprade P, Bert V, Proux O, Hazemann JL, Traverse AS, Marcus MA, Manceau A (2002) Forms of zinc accumulated in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Physiol* 130(4):1815-1826.
37. Küpper H, Mijovilovich A, Meyer-Klaucke W, Kronek MH (2004) Tissue- and age-dependant differences in the complexation of cadmium and zinc in the cadmium/zinc hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (Ganges Ecotype) revealed by X-Ray Absorption Spectroscopy. *Plant Physiol* 134:748-757.
38. De Jesus EFO, Simabuco SM, Dos Anjos MJ (2000) R.T.L. Synchrotron radiation X-ray fluorescence analysis of trace elements in Nerium oleander for pollution monitoring. *Spectrochim Acta B* 55:1181-1187.
39. Varga A, Martinez RMG, Zaray G, Fodor F (1999) Investigation of effects of cadmium, lead, nickel and vanadium contamination on the uptake and transport processes in cucumber plants by TXRF spectrometry. *Spectrochim Acta B* 54(10):1455-1462.
40. Sarret G, Schroeder WH, Marcus MA, Geoffroy N, Manceau A (2003) Localization and speciation of Zn in mycorrhized roots by mu SXRF and muEXAFS. *J Phys IV* 107:1193-1196.
41. Naftel SJ, Martin RR, Sham TK, Macfie SM, Jones KW (2001) Microsynchrotron X-ray fluorescence of cadmium-challenged corn roots. *J Electron Spectrosc Relat Phenom* 119(2-3):235-239.

42. Polatajko A, Jakubowski N, Szpunar J (2006) State of the art report of selenium speciation in biological samples. *J Anal At Spectrom* 21:639-654.
43. Lombi E, Scheckelc KG, Kempsond IM (2011) In situ analysis of metal(loid)s in plants: State of the art and artefacts. *Environ Exp Bot* 72(1):3-17.
44. Pickering IJ, Prince RC, Salt DE, George GN (2000) Quantitative, chemically specific imaging of selenium transformation in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:10717-10722.
45. Freeman JL, Zhang LH, Marcus MA, Fakra S, McGrath SP, Pilon-Smits EAH (2006) Spatial imaging, speciation, and quantification of selenium in the hyperaccumulator plants *Astragalus bisulcatus* and *Stanleya pinnata*. *Plant Physiol* 142:124-134.
46. Cruz-Jimenez G, Peralta-Videa JR, de la Rosa G, Meitzner G, Parsons JG, Gardea-Torresdey JL (2005) Effect of sulfate on selenium uptake and chemical speciation in *Convolvulus arvensis* L. *Environ Chem* 2:100-107.
47. Bulska E, Wysocka IA, Wierzbicka MH, Proost K, Janssens K, Falkenberg G (2006) *In vivo* investigation of the distribution and the local speciation of selenium in *Allium cepa* L. by means of microscopic X-ray absorption near-edge structure spectroscopy and confocal microscopic X-ray fluorescence analysis. *Anal Chem* 78:7616-7624.
48. Williams PN, Lombi E, Sun GX, Scheckel K, Zhu YG, Feng XB, Zhu JM, Carey AM, Adomako E, Lawgali Y, Deacon C, Meharg AA (2009) Selenium characterization in the global rice supply chain. *Environ Sci Technol* 43:6024-6030.
49. SIXPACK software package (2004). Powered by IFEFFIT 1.2.6 Copyright Matt Newville, University of Chicago, EEUU.
50. Kim CS, Bloom NS, Rytuba JJ, Brown GE Jr (2003) Mercury speciation by X-ray adsorption fine structure spectroscopy and sequential chemical extractions: A comparison of speciation methods. *Environ Sci Technol* 37:5102-5108.
51. Miller JN, Miller JC (2002) *Estadística y quimiometría para química analítica*, Pearson Educación SA, 4ª edición, Madrid.
52. SMAK software package (2006). Copyright Sam Webb, University of Stanford, EEUU.
53. Statsoft Electronic Statistics Textbook (2012), [recurso en línea], <http://www.statsoft.com/textbook/>, [10/09/2012].
54. Thavarajah D, Vandenberg A, Graham NG, Pickering IJ (2007) Chemical form of selenium in naturally selenium-rich lentils (*Lens culinaris* L.) from Saskatchewan. *J Agric Food Chem* 55:7337-7341.
55. Whanger PD (2002) Selenocompounds in plants and animals and their biological significance. *J Am Coll Nutr* 21:223-232.
56. Mounicou S, Vonderheide AP, Shann JR, Caruso JA (2006) Comparing a selenium accumulator plant (*Brassica juncea*) to a nonaccumulator plant (*Helianthus annuus*) to investigate selenium-containing proteins. *Anal Bioanal Chem* 386:1367-1378.
57. Li HF, McGrath SP, Zhao FJ (2008) Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite, *New Phytol* 178(1):92-102.
58. Brown TA, Shrift A (1982) Selenium: toxicity and tolerance in higher plants. *Biol Rev* 57:59-84.
59. De Samber B, Silversmit G, Evens R, De Schampelaere K, Janssen C, Masschaele B, Van Hooerebeke L, Balcaen L, Vanhaecke F, Falkenberg G, Vincze L (2008) Three-dimensional elemental imaging by means of synchrotron radiation micro-XRF: developments and applications in environmental chemistry. *Anal Bioanal Chem* 390(1):267-71.
60. Eustice DC, Kull FJ, Shrift A (1981) Selenium toxicity: aminoacylation and peptide bond formation with selenomethionine. *Plant Physiol* 67:1054-1058.

CONCLUSIONES

Los resultados de los estudios que recoge la presente memoria están descritos en los correspondientes capítulos que la integran. En cada uno de estos capítulos se han detallado las conclusiones específicas de los estudios relacionados. Teniendo en cuenta esta información previa y con la finalidad de facilitar una visión global de los resultados de los estudios realizados, en este apartado se resumen las conclusiones de mayor relevancia en relación con los tres objetivos planteados inicialmente:

OBJETIVO 1

El efecto del selenio en los parámetros fisiológicos y en la acumulación tanto del selenio, como de los distintos micro y macronutrientes analizados en el trigo cultivado hidropónicamente, se ha determinado que depende de dos factores principales: la forma de selenio con que se enriquece el cultivo inicialmente (selenito, selenato o ambas en cultivo mixto) y la cantidad total de selenio inicial en el medio hidropónico.

Los estudios fisiológicos han demostrado que el enriquecimiento del cultivo hidropónico con una mezcla equimolar de ambas especies de selenio (selenito y selenato) da lugar a una atenuación de las toxicidades observadas a nivel fisiológico al aplicar las mismas especies separadamente y, en consecuencia, proporcionan una buena estrategia de enriquecimiento.

Adicionalmente, los resultados de especiación directa por XAS proporcionan los datos que determinan la estrategia más adecuada de enriquecimiento del trigo en el sentido de una mayor concentración de selenoaminoácidos en los tallos, lo que se consigue mediante la mezcla de ambas especies en concentraciones equivalentes, observación que complementa lo observado en los estudios de los parámetros fisiológicos.

OBJETIVO 2

En los estudios preliminares de los efectos en los parámetros fisiológicos en la especie de trigo cultivada en respuesta al estrés por mercurio se ha determinado una concentración EC_{50} de 2 μ M de Hg. Concentraciones de mercurio superiores suponen claros efectos fitotóxicos

en todos los sentidos: inhibición del crecimiento radicular, disminución del peso fresco de tallos y raíces y daños en las paredes celulares vegetales.

De las dos especies de selenio estudiadas con potenciales efectos beneficiosos para las plantas de trigo (fitoremediantes), se determinó que una concentración en el medio de cultivo de $1\mu\text{M}$ de Se, en forma de selenito, daba lugar a una clara inhibición de la absorción de mercurio. Por el contrario, si en lugar de selenito se adiciona selenato, se observan efectos totalmente contrarios, suponiendo la presencia de selenato un incremento notable de la absorción de mercurio.

Los efectos fitoremediantes descritos también se observaron en el análisis *in-situ* de la distribución de selenio y mercurio mediante $\mu\text{-XAS imaging}$ en las raíces y tallos del trigo, complementándose así satisfactoriamente ambos estudios.

Finalmente, se puede confirmar que la mejor estrategia a seguir para poder observar efectos fitoremediantes que supongan la inhibición de la absorción de mercurio en el trigo supondría aplicar un enriquecimiento de la planta con selenito. Al ser un estudio preliminar, es de especial importancia destacar que no se evaluaron los efectos de la mezcla de ambas especies, lo cual sería interesante estudiar en futuros trabajos.

OBJETIVO 3

La especiación directa mediante la técnica XANES se ha aplicado satisfactoriamente para la determinación de la especiación de selenio en muestras de trigo enriquecidas tanto con selenito como con selenato y la mezcla de ambas especies.

Concretamente, se han evaluado especies de selenio tanto orgánicas como inorgánicas y se ha validado el método mediante el análisis tanto de un CRM como de muestras sintéticas. Adicionalmente, se ha conseguido obtener espectros en muestras con cantidades de selenio relativamente bajas para la sensibilidad de la señal de absorción sincrotrón, pudiéndose cuantificar adecuadamente todas las muestras analizadas.

Estos resultados han puesto de manifiesto una relación clara entre la composición de selenoaminoácidos en la planta y la composición en selenio en la disolución de cultivo hidropónico. Dicha relación revela la funcionalidad entre las propiedades redox de dicha

solución de cultivo y las proporciones relativas de los selenoaminoácidos producidos. De esta forma se ha establecido la forma de sintonizar químicamente la producción de selenoaminoácidos específicos en las plantas de trigo. Esta sintonización, objeto de una patente, nos permitiría controlar la producción de selenoproteínas en la planta de trigo lo que conllevaría superar la deficiencia de estabilidad y reproducibilidad de dichos cultivos.

Paralelamente, se ha demostrado que el μ -XAS *imaging* es una potente técnica analítica basada en radiación sincrotrón para identificar la localización, distribución en el trigo y posibles correlaciones de elementos como el selenio y el mercurio a niveles traza y de macronutrientes a concentraciones más elevadas como son el calcio, el potasio y el azufre.

Perspectivas de futuro

Finalmente, considerando los estudios desarrollados, los resultados obtenidos y las conclusiones aquí descritas, se recogen a continuación las perspectivas de futuro del trabajo de investigación realizado:

- El siguiente paso en lo que a especiación de selenio se refiere, sería complementar los resultados de la especiación directa en sincrotrón con la aplicación de técnicas de especiación indirecta mediante la extracción de las especies de interés con métodos enzimáticos y el posterior análisis con el acoplamiento HPLC-ICP-MS.

- Es importante destacar que en los estudios de la presente tesis doctoral, el trigo ha sido cultivado hidropónicamente y que, en consecuencia, los resultados no pueden ser directamente extrapolados a un posible cultivo en suelo sin llevar a cabo estudios adicionales, dado que el comportamiento del selenio puede ser distinto al estar expuesto a la presencia de otros compuestos químicos, biológicos y sus posibles interacciones. Es por este motivo que una importante perspectiva de futuro en este sentido, supondría aplicar los resultados aquí

presentados para llevar a cabo experimentos en suelos reales y elucidar así la respuesta del trigo bajo condiciones reales de cultivo.

- Es especialmente destacable que todos los métodos que se han presentado en este trabajo relacionados con la especiación directa mediante técnicas de radiación sincrotrón como XANES y μ -XAS *imaging* pueden ser extrapolados a aplicaciones para el estudio de otros tipos de muestras vegetales e incluso para la evaluación de otros elementos de interés a nivel biológico y medioambiental.

ANEXOS

ANEXO 1

Dual effects of different selenium species on wheat

B. Guerrero, M. Llugany, O. Palacios and M. Valiente

To be submitted

Dual effects of different selenium species on wheat

B.GUERRERO^a, M.LLUGANY^b, O.PALACIOS^c and M.VALIENTE^{a*}

^aUniversitat Autònoma de Barcelona, Centre GTS, Department of Chemistry, 08193 Bellaterra (Barcelona), Spain, bea.guerrero.lopez@gmail.com and manuel.valiente@uab.cat*

^bUniversitat Autònoma de Barcelona, Laboratory of Plant Physiology, 08193 Bellaterra (Barcelona), Spain, merce.llugany@uab.cat

^cUniversitat Autònoma de Barcelona, Inorganic Chemistry Unit, Department of Chemistry, 08193 Bellaterra (Barcelona), Spain, oscar.palacios@uab.cat

* Corresponding Author

ABSTRACT

Wheat (*Triticum aestivum*) and its derivative products account for a major source of dietary intake of selenium (Se) in humans and animals, because of its essentiality due to its presence in vital enzymes. Se antioxidant role has resulted in the popularity of agronomic biofortification practices in Se deficient areas. Controlling Se uptake, metabolism, translocation and accumulation in plants will be important to decrease healthy risk of toxicity and deficiency and to help selecting adequate methods for biofortification.

Selenate and selenite are the two main inorganic Se forms available in soil and in most of the studies are given separately. That study reveals that both Se species behave differently but combined the prevalent pattern is that of selenite; so it is taken up faster and it seems that interferes with selenate uptake and transport. Se has dual effects on wheat plants; at low concentrations it acts as growth stimulant whereas at high concentrations it reduces root elongation and biomass production and alters uptake and translocation of several essential nutrients.

HIGHLIGHTS

> We studied Se uptake, translocation and accumulation in wheat hydroponic cultures. > The effects of Se depends on Se form (selenite or selenate) and the total Se amount in growth media. > Se has dual effects not only on wheat plant growth but also on nutrient uptake.

KEYWORDS

Selenium, wheat, toxicity, ICP-MS.

INTRODUCTION

Selenium (Se) has received considerable scientific attention during the past century. It is an essential trace element for humans and animals mainly due to its presence in several vital enzymes, such as glutathione peroxidase [1,2,3]. Its biological importance and its putative anticancer activity [4] have resulted in the popularity of food supplements [5,6,7]. The narrow margin between toxicity, essentiality and deficiency grows up the interest in Se because of both health and environmental impacts [8].

The most important human source of Se is food; therefore plants play an important role in Se supplementation [9]. Plants synthesize selenoproteins from Se containing soils, hence Se content of crops depends on soil Se richness. Se bioassimilation processes are important to better understand growth parameters changes and nutrient uptake in correlation with Se uptake.

Cereal grains are poor sources of key mineral nutrients. As a result, the world's poorest people subsisting on a monotonous cereal diet are also those most vulnerable to mineral deficiencies. In this study we select wheat (*Triticum aestivum*) because its derivative products (breads, cakes, cereals, pasta...) are an important source of Se for human diet [10,11]. Wheat is a non-Se-accumulator plant and the threshold Se-toxicity concentration is dependent on the form of Se accumulated [12]. On the other hand, Se concentration in wheat shows great variations between countries and regions [13].

With respect to Se determination in plant samples and hydroponic solutions, ICP-MS has been applied as one of the most powerful tools for trace level concentration analysis using H₂ gas collision cells [14,15,16].

The particular element chemical form determines toxicity, biological activity, bioavailability and environmental impact [3]. The relative availability of selenate and selenite in nutrient solutions depend on the presence of competing ions [17]. Several studies report that selenate competes with sulphate transporters for uptake by plants, however little is known about selenite uptake which seems to have a great passive component and a minor active one mediated by phosphate transporters [18,19,20,21,22,23,24,25]. In our study, selenite in nutrient solution at pH 6.0 exists primarily as HSeO₃⁻ (Geochem, data not shown) and behaves as a weak acid that can compete with phosphate uptake. Hopper and Parker [17] demonstrated that the inhibition of sulfate by selenate is stronger than that of phosphate by selenite. Taking into account these findings in our experiments, levels of both nutrients have been lowered to avoid part of this competition [26].

Se oxidation state depends on pH and redox potential of soil and those parameters are strongly dependent on season factors: soil composition, water content, organic matter and bacteria activity. Even thus, it has been observed that in acidic grounds selenite is the main Se form while in basic ones selenate, much more soluble than selenite, is the most abundant form [27], so the soil coexistence of both forms can be easily found. Considering that selenite exhibits higher toxicity than selenate, but selenate is more soluble, and thus available for plants, Se toxicity can be also related with soil redox potential. For these reasons, the effect of both selenium forms, separately and together, must be considered in order to assess the mechanisms which prevent or promote Se plant toxicity. It must be also considered that selenium concentrations ranging from 3 to 330 µg/L have been detected in shallow post mining grad water from coal mines [28,29] and its accumulation in soils can be high enough to be hazardous for animals and plants.

In this work, wheat plants were exposed to Se in the form of either sodium selenate, sodium selenite or a mixture of both, in order to study the effect of chemical speciation on Se bioavailability and to better understand Se-mechanisms of uptake, transport, metabolism, nutrient interaction and tolerance. Although, there are some studies about the effect of Se on the uptake of essential elements in plants [25,30,31], interaction between Se and essential nutrients is not still well understood, while the effect of both Se species presence on nutrient uptake has been poorly studied.

EXPERIMENTAL

Plant material and culture conditions

Triticum aestivum cv. Pinzón (Semillas Fitó S.A., Spain) was used in this study as soft wheat well-known for its high flour quality. Before starting the hydroponics culture, seeds were germinated on moist filter paper for 3 days in an incubator at 25°C. Seedlings were then transferred to 1 L plastic pots and were allowed to acclimate and grow for a week with ¼ strength Hoagland's nutrient solution. Afterwards plants were exposed to 5 days-long under different Se supplementation treatments.

The composition of the nutrient solution was: 1.0 mM KNO₃, 1.0 mM Ca(NO₃)₂, 0.25 mM MgSO₄, 0.5 mM K₂HPO₄, 2.0 µM MnCl₂, 3 µM H₃BO₃, 0.1 µM (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 2 µM ZnSO₄, 1 µM CuSO₄ and 60 µM FeNa-EDTA. The pH of this solution was buffered at 6.0 with 2 mM MES (2-morpholinoethanesulphonic acid, pH adjusted with KOH). The solution was aerated continuously and renewed twice in the middle of growth period. The culture was carried out in a controlled culture chamber with the following conditions: a photoperiod of 16 h day/8 h night, a temperature of 24°C day/18°C night and a light intensity of 320 µE m⁻² s⁻¹.

Selenium enrichment

The enrichment treatments were done by adding Se to the nutrient solution cultures in the form of sodium selenite ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Fluka) and sodium selenate (Na_2SeO_4 , Fluka) separately at four different Se concentrations: 1 μM , 10 μM , 50 μM and 100 μM . Additionally, the same Se total concentrations levels were reached by mixing both Se species at equal quantities. These treatments with mixed species are abbreviated as 0.5+0.5, 5+5, 25+25 and 50+50.

Each plastic pot had three plants and each Se treatment was duplicated. It is noteworthy that plant roots and shoots, separately, from each pot were mixed together before digestion. In addition, the complete hydroponics culture experiment was done twice.

Sample preparation

After 5 days of incubation in Se enriched media, plants were harvested and roots desorbed with CaCl_2 solution to remove Se in root apoplast. After desorption, plants were rinsed with distilled water, divided into shoots and roots, frozen into liquid nitrogen and lyophilised. Aliquots of nutrient solutions were taken for analysis of total Se and root elongation were measured to study the relative plant growth.

Plant samples were digested in a microwave oven (Mars 5, CEM, USA) equipped with HP500 PFA vessels (CEM, USA) with 2 mL of 70% HNO_3 and 2 mL of MilliQ water under EPA 3052. The obtained digested solution was filtered, properly diluted with MilliQ water and analysed to determine total Se concentration and other elements.

Total Se and nutrient elements determination

Corresponding samples were analysed in an ICP-MS (PQExCell, Thermo Elemental, UK) to determine total Se concentration in each plant part. A standard solution of 1000 mg L^{-1} Se purchased from Aldrich (USA) was used for the calibration procedure. A 3 mL min^{-1} hydrogen flow pressurized the collision cell [32].

SELM-1 CRM (Selenium Enriched Yeast Certified Reference Material, NRC, Canada) was analysed to test and validate total Se determination by ICP-MS. The analysed Se content was $1980 \pm 41 \text{ mg/kg}$ (expressed as average \pm SD, $n=3$), result in agreement with the values determined by NRC ($2059 \pm 64 \text{ mg/kg}$) [33].

Wheat shoots and roots digested samples were analysed by ICP-OES (Optima 3200RL, Perkin Elmer, USA) to determine the concentration of macronutrients (Ca, K, Mg, P and S) and several micronutrients (Cu, Fe, Mn and Zn). Corresponding standard 1000 mg L^{-1} solutions purchased from High Purity Standards (USA) were used for the calibration procedure.

Data analysis

Statistical analysis for comparison of means between different treatments was done by a two sample t-test at a significant level of 0.05 with SPSS software package. All results are expressed as means of 4 replicates with corresponding standard errors.

RESULTS

Results, expressed in terms of wheat growth parameters, Se distribution and concentration in wheat and nutrient uptake effects, have been analysed to determine various effects of Se uptake.

Growth parameters

To check the effect of Se on plant growth several parameters were used: root elongation, shoot and root weight, and nutrient solution absorption, connected with normal plant growth needs.

Results obtained when adding Se at different levels showed that enrichments up to 10 μM Se caused a slightly higher root elongation for selenate treatment (Fig. 1a). By contrast, selenite and mixture treatments at the same range showed no significant differences in root elongation in comparison with the control.

At higher Se concentrations root elongation decreased, reaching the minimum value at 100 μM Se, when visible toxic symptoms could be observed in shoots (strong chlorosis and wilting). These results showed an external Se effect concentration for a 50% inhibition of root elongation (EC_{50}) of around 100 μM Se for selenite and selenate but not for the mixture of them.

Figure 1b and 1c show that the addition of Se in the range of 0-10 μM did not significantly affect root and shoot fresh weight. On the other hand, above 10 μM Se root and shoot fresh weight started to decrease significantly, in agreement with root elongation changes mentioned before.

In Figure 1d it can be seen an initial increase of volume of nutrient solution absorption followed by a decrease when Se concentrations applied were greater than 10 μM due to a poorer root absorption capacity.

Se concentration and distribution in wheat

In Figure 2 Se accumulation and distribution between roots and shoots are shown. For the sake of clarity, these results have been divided into two figures, related with total Se supplemented in the medium: Figure 2a, from 1 to 10 μM total Se concentration; and Figure 2b, from 50 to 100 μM total Se concentration. It is worthy to note that when selenate stimulates root elongation growth (1 and 10 μM treatments) Se accumulated in wheat plants is about 2.5-fold lower than that for selenite. However, when we worked with toxic selenate concentrations (50 and 100 μM treatments) Se contained in wheat exceeded 1.2-1.65 times those of selenite (Fig. 2).

The percentage of Se distribution kept constant with changes in Se concentration of each enrichment treatment. For selenite and mixture enrichments, Se is mainly accumulated in roots (80% and 70%, respectively), while for selenate the accumulation pattern was different depending on external concentrations. At the lowest selenate concentration (1 μM) Se was equally distributed between roots and shoots: with a 10 μM selenate supply Se levels were two fold higher in shoots than in roots and at the two highest external selenate concentrations, Se was mostly accumulated in shoots at the same percentages (85%). As it can be observed, the different pattern in total Se accumulation could be explained by a different rate of selenate uptake depending on its external concentration. The highest Se concentration found in roots was 335 $\mu\text{g g}^{-1}$ while in shoots was 580 $\mu\text{g g}^{-1}$ which corresponds to the individual highest external selenite and selenate concentrations, respectively.

The shoot/root ratio of total Se content in wheat plants ranged from 0.74 to 5.98 for plants supplied with selenate and was less than 0.25 for plants supplied with selenite, while this ratio ranged from 0.31 to 0.42 when a mixture of Se forms was supplied.

Nutrient uptake

The concentration of several important macro (Ca, K, Mg, P and S) and micronutrient (Cu, Fe, Mn and Zn) elements were analyzed for all treatments to evaluate the effect of Se supplementation on nutrient uptake. Results are shown in figures 3 and 4, excluding mixture treatments.

Effects on macronutrients

It is very important to notice that the increase or decrease in macronutrient concentration was never higher than 35% (Fig. 3), being Ca and S the most affected by Se supplementation. Results also show that no redistribution of elements between root and shoot was observed. The decrease in root nutrient concentration, when observed, was never compensated by the concentration in shoots except for S in plants exposed to high selenate.

In Figure 3a, Ca root uptake was more affected by low Se exposures than under toxic levels (50 and 100 μM Se), especially when applied as selenate. Minor changes in Ca concentration were observed in shoots.

In Figure 3b it can be observed that selenite had greater effect on K uptake than selenate at low exposures (up to 10 μM Se). On the other hand, at high Se levels (up to 50 μM) no significant differences were observed between Se forms. In shoots, K accumulation was not significantly altered by any Se addition.

In Figure 3c it is shown that root Mg uptake suffered different tendencies depending on Se form applied: selenite enrichment caused a decrease in Mg levels, reaching a plateau at 50 μM Se, while selenate decreased Mg uptake up to 10 μM Se but at higher exposures increased it till control Mg levels. Shoot Mg concentrations under Se exposure were similar to control levels except for 50 and 100 μM of selenite, where Mg levels were significantly lower.

Both selenite and selenate caused a similar decrease in root P concentration at high Se supplementation (Fig. 3d). In shoots P level was increased by both Se forms at low exposures while was slightly decreased at high Se exposure, especially by selenate.

In Figure 3e it can be seen that S uptake by roots was not dependent on the Se species added (including mixtures) but on Se concentration. At low Se supply (up to 10 μM) S uptake was slightly higher than in control, while for higher Se levels (50 and 100 μM), S content was lower than in control. In shoots all selenite treatments and mixtures showed similar response as in roots, while high selenate concentrations (50 and 100 μM) increased significantly shoot S accumulation, compensating the low S root levels to values of total S even higher than those found in control plants (data not shown).

Sulphate uptake was not reduced by selenate competition but S distribution was strongly affected under Se exposure. Selenate at high concentrations enhanced S translocation to shoots.

Effects on micronutrients

High selenate concentrations stimulated Cu and Mn root uptake by 12-24% and 30-35% respectively (Figs. 4a and 4c); whereas had no effect on shoot Cu accumulation but a 20% reduction on shoot Mn level. High selenite exposures ($>10 \mu\text{M}$) inhibited Cu and Mn accumulation in both roots and shoots with a great impact (*ca.* 50% reduction) in shoot Mn level.

As can be seen in Figure 4b, the effect of Se addition on Fe uptake and accumulation was stronger in the form of selenate than of selenite. In roots $10 \mu\text{M}$ selenate causes a Fe reduction of about 50% that was partially recovered at higher concentrations almost reaching the control level. Shoot effects were less intense than those observed on roots.

The effect of Se in root Zn concentration was mainly noticed at Se levels above $50 \mu\text{M}$, causing both species the same stunt, but in shoots the behaviour was different: Zn was slightly increased by external low selenite supply compared with values on control plants (Fig. 4d).

DISCUSSION

Growth parameters

The effects of the presence of increasing amounts of selenite and selenate observed in Figure 1 can be seen on the root elongation, the fresh weight of both roots and shoots and on the amount adsorbed from plant solution. These results confirm a duality of Se effects concerning both the level of concentration applied to the nutrient solution and the chemical form of Se used to feed plants. Such duality of Se concentration has been previously reported in other works [17,25,34,35] but they have only tested individual Se forms and neither their mixtures. The toxicity observed can be interpreted as the irruption of selenium species on both the amino acids generation process and possibly on the cellular energy production path.

Interestingly, the presence of both Se species mixed together in nutrient solution at highest concentrations tested (25+25 and 50+50) show lower toxicity than selenite alone at 50 or $100 \mu\text{M}$, suggesting that selenate attenuates toxicity of selenite in mixtures.

Se concentration and distribution in wheat

Most plants contain less than $25 \mu\text{g Se g}^{-1}$ dry matter and are termed non-accumulators [26]. Such plants absorb Se but are incapable of tolerating high Se in their tissues and environment, thus Se toxicity occurs below about $10\text{-}100 \mu\text{g Se g}^{-1}$ dry matter, although the exact value depends critically upon the selenate:sulfate molar ratio in the rhizosphere solution. These plants tolerate low Se concentrations in the rhizosphere by restricting Se uptake and movement to shoots [36,37]. Spring wheat is considered a non-Se-accumulator but it has relatively high tolerance when compared with other non-accumulator plants because Se toxicity occurs above $100 \mu\text{g Se g}^{-1}$ dry matter. The observed high accumulation of Se in shoots in selenate enrichments compared with that of selenite is in agreement with other results [22,23,24,25] where it was proposed that selenate readily competes with sulfate for uptake by plants and is probably assimilated actively by sulphur transport pathway in chloroplasts due to their chemical analogy, replacing cysteine and methionine in proteins. Concerning total Se concentration in whole plant, two different behaviours could be observed: at low external Se levels (1 and $10 \mu\text{M}$) the highest total Se concentration was observed in selenite cultures, while at high external Se levels (50 and $100 \mu\text{M}$) it was selenate exposed plants which exhibited a higher concentration. Surprisingly, at low external Se concentrations Se level in plants treated with mixtures was always a bit lower than total Se of plants treated with selenite but higher than the level found in plants treated with selenate. Even more, at high external Se supply, Se level in plants exposed to mixtures was always lower than those of plants treated with individual Se forms. These results could be due to a possible interaction between selenite and selenate. It seems that selenite uptake is favoured in front of selenate because most Se accumulated from mixture treatments is found in roots, organ where selenite preferentially accumulates when individually applied. The intensity of the interaction remains constant with increasing external Se mixture concentration as can be seen by the constant Se distribution in all Se mixture treatments (25-30% shoots/70-75% roots). Thus, low Se tissue level found in plants treated with high Se mixture concentrations is probably due to a greater translocation of Se at high external selenate levels but not to a major interaction between different Se species.

The efficiency of wheat plants to transport selenate to shoots (80%) can be due to two complementary mechanisms: a way of protecting the plant against selenate toxicity by accumulating it in leave vacuoles and a way that facilitates part of its further elimination by formation of Se volatile species. In our study Se volatilization was not observed so the most probable mechanism of Se detoxification is compartmentalization of Se in leave vacuoles which is a less toxic form because it has poor mobilization and incorporation into proteins.

On the other hand, selenite tends to accumulate in roots more than in shoots which is in accordance with the literature [17,25] and only about 20% of selenite taken up has been transported to shoots which is comparable to the small fraction found by Arvy [21] and the 10% reported by De Souza et al. [38]. This unequal distribution can be explained by the non-enzymatic transformation of selenite to toxic organoselenium species, which are not transported from roots to shoots. Organic Se forms can readily enter sulphur assimilation pathways [39,40]. At shoot Se comparable levels (10 μM), Se from selenate treated plants stimulated root growth while selenite did not as observed in *Astragalus lentiginosus* [41].

In the case of mixture experiments, distribution between roots and shoots resembles more to the one of selenite. This may suggest that the presence of selenite in the medium blocks the transportation of selenate to shoots. This observation, together with the fact that selenite accumulates mainly in roots, can be the explanation for the parallelism observed for plants supplemented with only selenite and mixtures in terms of growth parameters related with roots. In general, the transport of Se from roots to biomass is closely connected with the chemical Se applied form [42].

Nutrient uptake

In general trends we can observe that the uptake of macronutrients was less affected by the presence of Se than that of micronutrients, as already expected if we take into account the important role of these macronutrients in plant surviving. Se effect on roots was different from its effect on shoots; and those elements which mainly accumulate in roots (i.e. Ca, Fe, Zn and Mn) were more sensible to Se presence.

Ca presence is essential in the cell wall and together with K are in charge of membrane integrity thus the increased Ca and Mg level with increasing high Se concentration (Fig. 3a and 3c) could be a way to re-establish the integrity of root membranes under severe Se toxicity.

The fact that shoot P level is more affected by selenate than by selenite which is the form that has chemical similarity with phosphate suggests that selenite is not interfering with P uptake at low concentrations but at high Se:P ratios an increase in competition together with other metabolic interactions are responsible of the decreased tissue P level.

Our results are in accordance with that from Wu and Huang [37] with tall fescue where Ca concentration was increased but P concentration was decreased under Se stress and with those from Hopper and Parker [17] who found an inhibition of P uptake by Se.

The extraordinary S uptake and translocation to shoots at high selenate treatments (Fig. 3e) is in agreement with Bell et al. [43]. A comparative study conducted by these authors on the antagonism between selenate and sulfate concluded that Se accumulators preferentially absorb Se in the face of competition with sulfate but non-accumulators discriminate against selenate uptake relative to sulfate. They observed that the non-accumulator plant had increased shoot S concentration by increasing selenate in solution, but only when shoot Se was above 20 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW. In our study wheat plants that presented these high shoot S level have above 250 $\mu\text{g Se g}^{-1}$ DW while plants with no change in shoot S levels have less than 30 $\mu\text{g Se g}^{-1}$. Selenate-induced stimulation of S uptake may be a result of incipient Se toxicity, which is in accordance with root-elongation and growth-inhibition by this Se species.

It is proved that expression regulation of high-affinity sulfate transporter genes (HAST) is mediated by S plant status, where elevated concentrations of sulfate and glutathione (GSH) down-regulate transcription and O-acetyl-L-serine (OAS) increases transcription [44,45]. In our nutrient solution sulfate level could be suboptimum for wheat and with increasing selenate exposure competition between both ions increases causing induction in the expression of HAST. White et al. [26] suggested that inducible HAST are more selective for sulfate than constitutively expressed low affinity transporters in *A. thaliana*. Phytotoxicity of high Se levels is associated mainly with non-specific replacement of sulphur amino acids by their Se analogues [12]. Moreover, this effect may result from disturbances in mineral balance, which is indicated by the analysis of nutrient composition of wheat plants performed in the present experiment. In *Brassica oleracea* a positive correlation between selenate concentration in solution and Se and S uptake was found [46].

Concerning micronutrients, Fe uptake showed a differential behaviour probably due to its high concentration in plants compared with other micronutrients. In both roots and shoots, all selenate treatments caused a reduction of Fe uptake. Chlorosis observed in plants exposed at toxic Se levels can be a consequence of the strong Se-interaction with Fe, Mn and Cu uptake [47,48,49]. Molnárová and Fargasová [50] found a strong photosynthetic pigment reduction in wheat under Se exposure that can be related with low Fe levels in shoots.

Cartes et al. [35] and previously Hartikainen et al. [34] reported the duality of Se effects on the antioxidative system in ryegrass. In our study, wheat presented toxicity symptoms and significant reduced root elongation growth at shoot Se concentrations above 30 mg kg^{-1} DW while below this concentration it had a stimulant effect on root growth and biomass production.

Results obtained allow to conclude that both Se species tested, selenite and selenate, behave differently when absorbed by wheat plants, and the effects are strongly dependent on Se species concentration in solution.

However, the uptake of macronutrients was not strongly affected by the presence of any Se form, while the effect in micronutrient uptake was directly related with the element studied, without observing a common behavior for all checked elements. Thus, regarding to Se supplementation of wheat plants, the form of Se applied should be taken into account as well as the total Se concentration.

Aspects of Selenium uptake mechanism

The observed differences on the distribution of Se in wheat plants after the uptake of corresponding inorganic forms of selenium, indicate that possible interconversion of selenate to selenite or vice versa is very improbable in both the hydroponic solution or in the wheat plant tissues. Thus, transport of selenate is more active than selenite, since Se is mostly accumulated on the plant shoots when using selenate, while using selenite, Se is accumulated in the plant roots so, according to [51], reveals a possible dependency on plant transpiration.

Hua-Fen Li et.al. [52] reported that the uptake of selenite depends on the related metabolism process. Thus, they indicate that spite of the similarity between the uptake rates of selenite and selenate by wheat, selenite is faster assimilated into organic forms in roots than selenate, having a lower mobility in xylem transport than selenate that is not readily assimilated into organic forms and will circulate fast in xylem transport. These properties can explain our results on the different distribution of Se in wheat plants when feeding them with each one of the two different Se species. Results corresponding to the mixture of the two species also support the interpretation of the individual behavior, so Se is mostly accumulated in roots because of the explained fast selenite uptake and also shoots are less loaded since selenite seems to hinder the transport of selenate in the xylem.

CONCLUSIONS

The presented results allow us to conclude that the effect of Se in the development of the assayed plants in hydroponic cultures strongly depends on two main factors: Se forms (selenite or selenate) and the amount of Se in the growth media. Thus selenite plays the more hazard role at higher concentrations. It can also be concluded that selenium accumulates mainly in roots thus been the most contaminated part of the plant, but the quantity of Se in shoots is also directly related with the amount of Se present in ground water, so toxicity can also be noticed in shoots.

This work has shown that the presence of Se do not significantly affect the uptake of macronutrients even if it slightly affects the uptake of some micronutrients, especially those accumulated in roots.

Finally, our results show that the presence in the hydroponic cultures of both Se forms, selenite and selenate, exhibit similar effects to those observed for selenite, suggesting that the presence of selenite blocks selenate uptake. This means that the presence of both forms together will probably reduce the higher toxicity attributed to selenate as the more available Se form in soils. Even thus, the mechanism of Se uptake under these conditions is still unclear, and further studies, including selenium speciation in different tissues, must be performed.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (Project CTQ2009-07432).

FIGURES

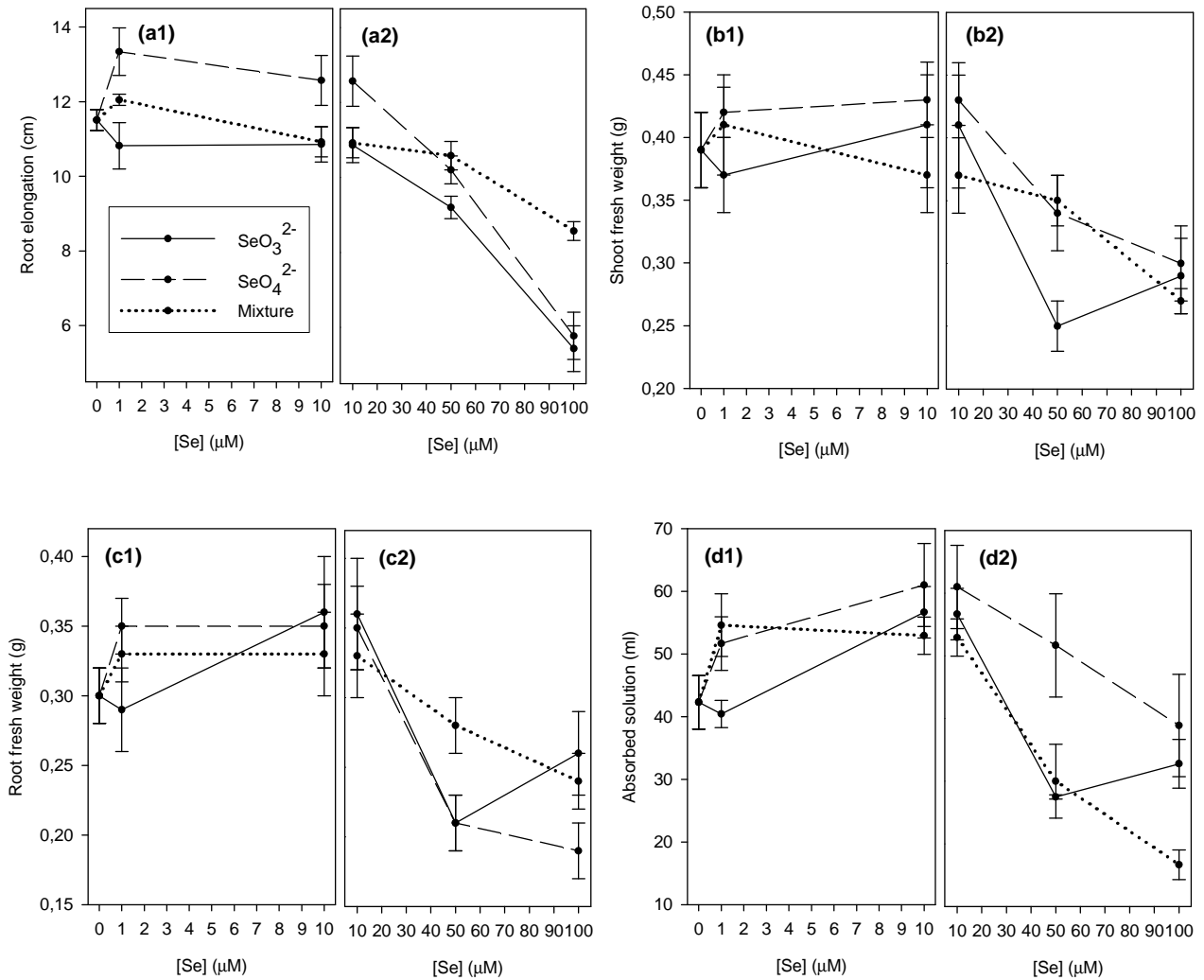


Fig. 1 Effects of selenite (SeO_3^{2-} , solid line), selenate (SeO_4^{2-} , dashed line) and both mixed species (Mixture, dotted line) on wheat growth parameters: root elongation (a), shoot fresh weight (b), root fresh weight (c) and absorbed solution (d). All plotted values are mean \pm standard errors ($n=4$).

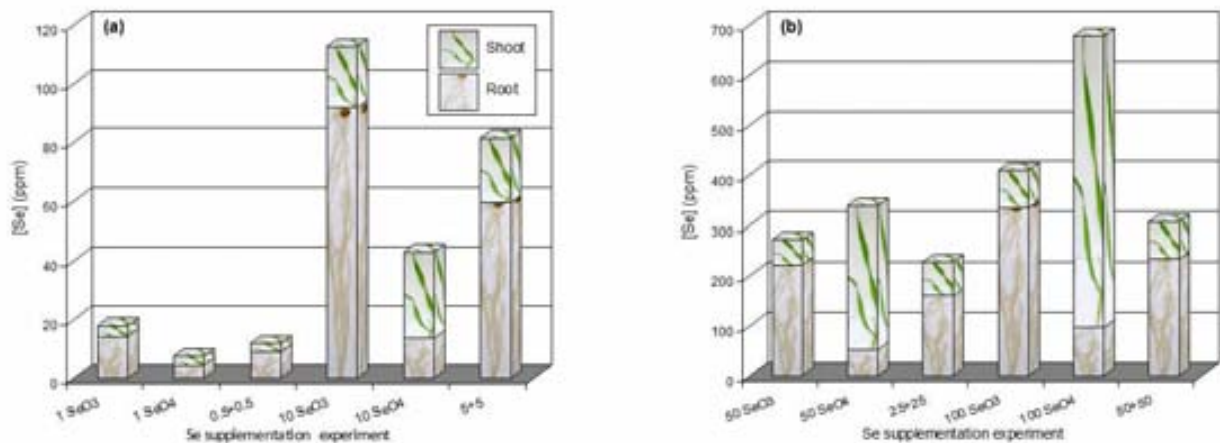


Fig. 2 Total Se concentration and distribution in roots and shoots of wheat plants at different Se concentrations: (a) 1 to 10 μM Se and (b) 50 to 100 μM Se.

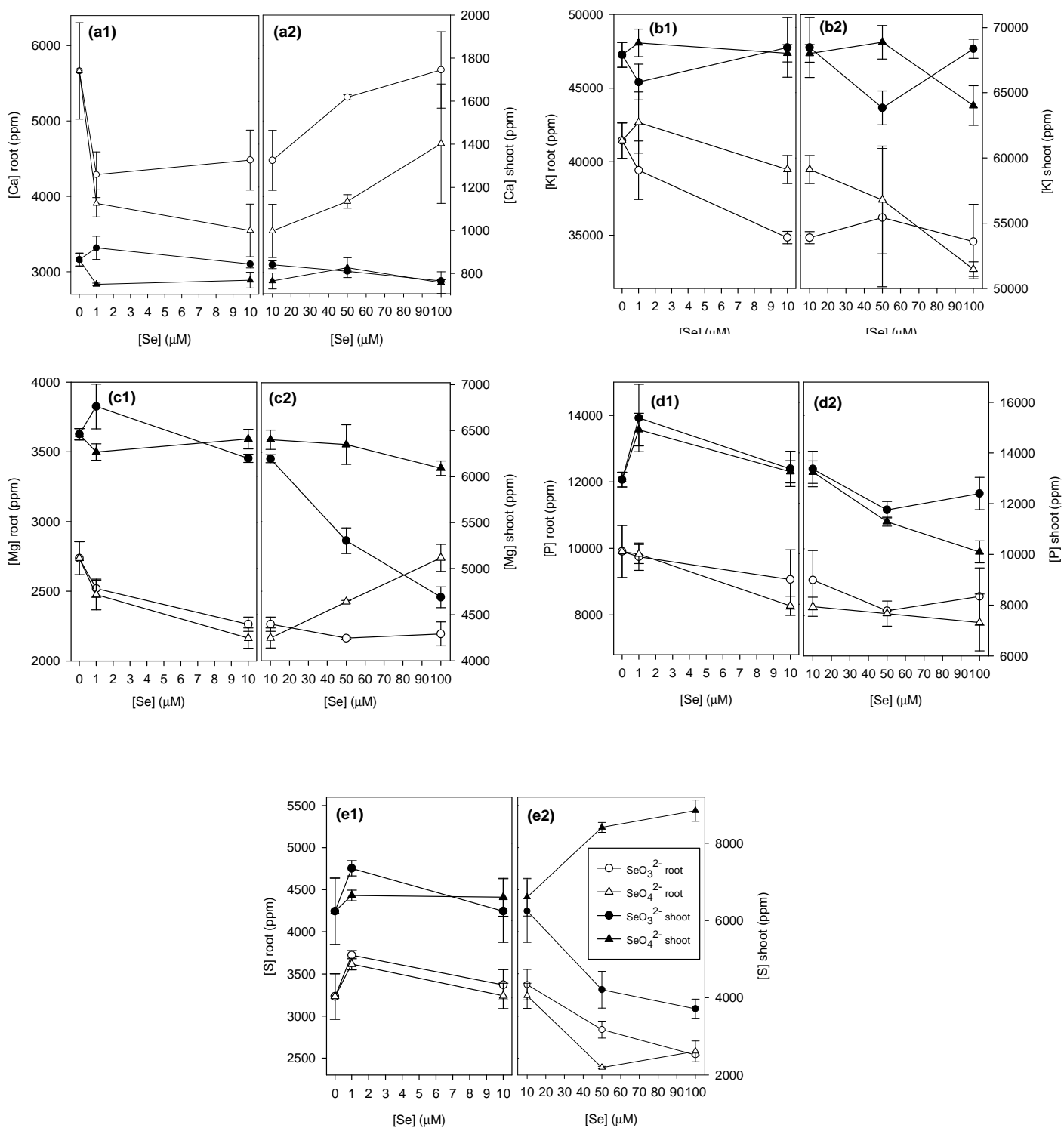


Fig. 3 Macronutrient concentration in roots (open symbols) and shoots (closed symbols) after selenite (SeO_3^{2-} , circles) or selenate (SeO_4^{2-} , triangles) supplementation.

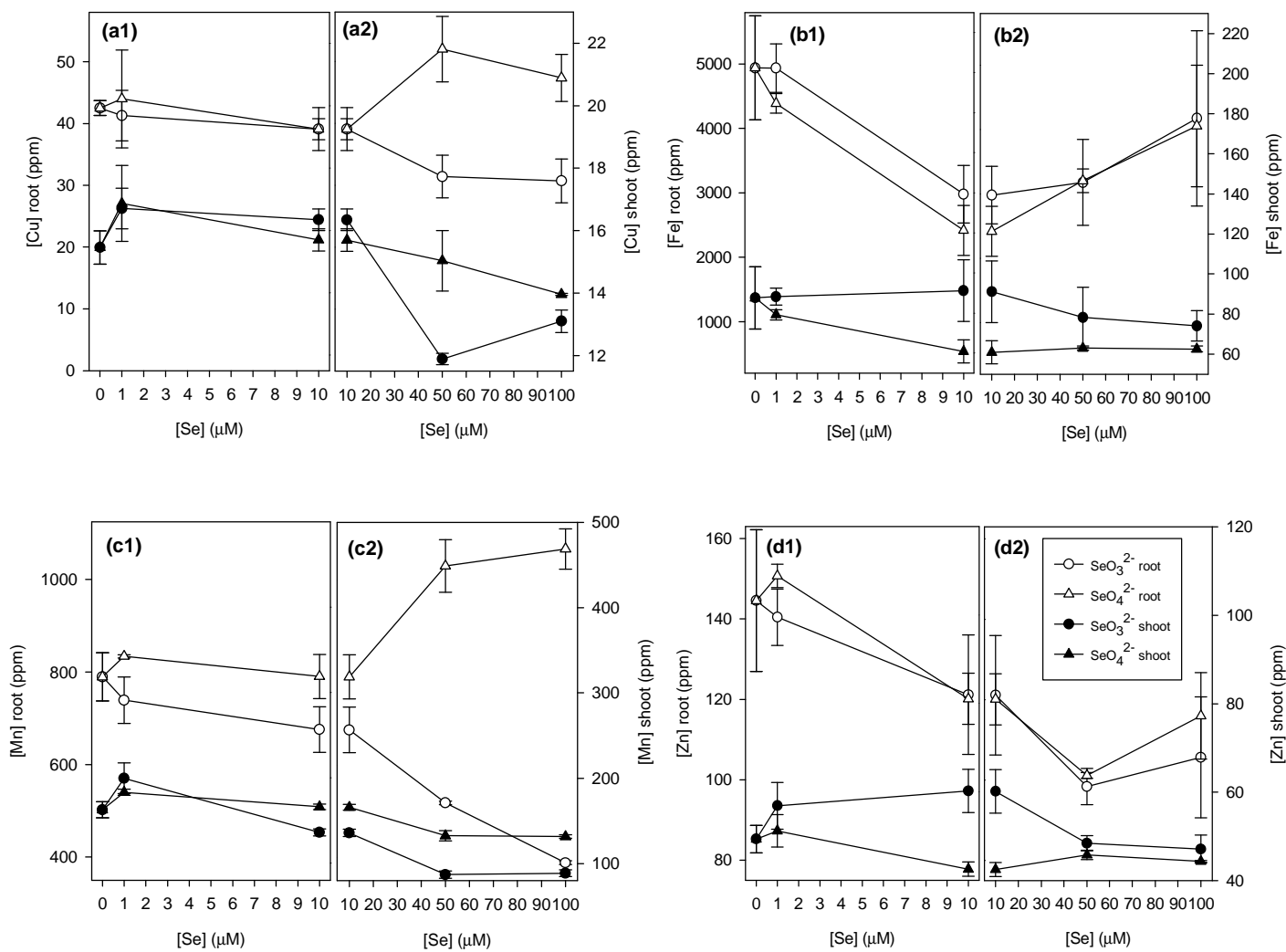


Fig. 4 Micronutrient concentration in roots (open symbols) and shoots (closed symbols) after selenite (SeO_3^{2-} , circles) or selenate (SeO_4^{2-} , triangles) supplementation.

REFERENCES

- [1] J.T. Deagen, M.A. Beilstein, P.D. Whanger, Chemical forms of selenium in selenium containing proteins from human plasma, *J. Inorg. Biochem.* 41 (1991) 261-268.
- [2] J.T. Deagen, J.A. Butler, B.A. Zachara, P.D. Whanger, Determination of the distribution of selenium between glutathione peroxidase, selenoprotein P, and albumin in plasma, *Anal. Biochem.* 208 (1993) 176-181.
- [3] A. Polatajko, N. Jakubowski, J. Szpunar, State of the art report of selenium speciation in biological samples, *J. Anal. At. Spectrom.* 21(7) (2006) 639-654.
- [4] L.C. Clark, G.F. Combs, B.W. Turnbull, E.H. Slate, D.K. Chalker, J. Chow, L.S. Davis, R.A. Glover, G.F. Graham, E.G. Gross, A. Krongrad, J.L. Leshner, H.K. Park, B.B. Sanders, C.L. Smith, J.R. Taylor, Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group, *J. Am. Med. Assoc.* 276 (1996) 1957-1963.
- [5] M. Navarro-Alarcon, C. Cabrera-Vique, Selenium in food and the human body: A review, *Sci. Total Environ.* 400 (2008) 115-141.
- [6] M.P. Rayman, The use of high-selenium yeast to raise selenium status: how does it measure up? *Br. J. Nutr.* 92 (2004) 557-573.
- [7] G.N. Schrauzer, Nutritional Selenium Supplements: Product Types, Quality, and Safety, *J. Am. Coll. Nutr.* 20(1) (2001) 1-4.
- [8] K. Pyrzynska, Determination of selenium species in environmental samples, *Microchim. Acta.* 140 (2002) 55-62.
- [9] J.W. Finley, Selenium accumulation in plant foods, *Nutr. Rev.* 63 (2005) 196-202.
- [10] G. Lyons, J. Stangoulis, R. Graham, High-selenium wheat: biofortification for better health, *Nutr. Res. Rev.* 16 (2003) 45-60.
- [11] M.J., Hawkesford, F.J. Zhao, Strategies for increasing the selenium content of wheat, *J. Cereal Sci.* 46 (2007) 282-292.
- [12] N. Terry, A.M. Zayed, M.P. de Souza, A.S. Tarun, Selenium in Higher Plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51 (2000) 401-432.
- [13] Y.G. Zhu, E.A.H. Pilon-Smits, F.J. Zhao, P.N. Williams, A.A. Meharg, Selenium in higher plants: understanding mechanisms for biofortification and phytoremediation, *Trends Plant Sci.* 14 (2009) 436-442.
- [14] V.D. Huerta, L.H. Reyes, J.M. Marchante-Gayon, M.L.F. Sanchez, A. Sanz-Medel, Total determination and quantitative speciation analysis of selenium in yeast and wheat flour by isotope dilution analysis, *J. Anal. At. Spectrom.* 18 (2003) 1243-1247.
- [15] M. Montes-Bayón, M.J.D. Molet, E.B. Gonzalez, A. Sanz-Medel, Evaluation of different sample extraction strategies for selenium determination in selenium-enriched plants (*Allium sativum* and *Brassica juncea*) and Se speciation by HPLC-ICP-MS, *Talanta* 68(4) (2006) 1287-1293.
- [16] R.T. Wilburn, A.P. Vonderheide, R.S. Soman, J.A. Caruso, Speciation of selenium in the mushroom *Boletus edulis* by high-performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma-mass spectrometry with a collision cell, *Appl. Spectrosc.* 58 (2004) 1251-1255.
- [17] J.L. Hopper, D.R. Parker, Plant availability of selenite and selenate as influenced by the competing ions phosphate and sulphate, *Plant Soil.* 210 (1999) 199-207.
- [18] C.J. Asher, D.G. Edwards, Modern solution culture techniques, in: A Lauchli, RL Bielecki (Eds.), *Encyclopedia of Plant Physiol, New Series* 15A, Springer-Verlag, Berlin, 1983, pp. 94-119.
- [19] J.M. Ulrich, A. Shrift, Selenium absorption by excised *Astragalus* roots, *Plant Physiol.* 43 (1968) 14-20.
- [20] T.C. Broyer, C.M. Johnson, R.P. Huston, Selenium and Nutrition of *Astragalus*. II. Ionic sorption interactions among selenium, phosphate, and macronutrient and micronutrient cations, *Plant Soil.* 36 (1972) 635-649.
- [21] M.P. Arvy, Selenate and selenite uptake and translocation in bean plants (*Phaseolus vulgaris*), *J. Exp. Bot.* 44 (1993) 1083-1087.
- [22] D.R. Ellis, D.E. Salt, Plants, selenium and human health, *Curr. Opin. Plant Biol.* 6 (2003) 273-279.
- [23] H.F. Li, S.P. McGrath, F.J. Zhao, Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite, *New Phytol* 178(1) (2007) 92-102.
- [24] E. Govasmark, B.R. Singh, J.A. MacLeod, M.G. Grimmett, Selenium concentration in spring wheat and leaching water as influenced by application times of selenium and nitrogen, *J. Plant. Nutr.* 31 (2008) 193-203.
- [25] R.W. Feng, C.Y. Wei, S.X. Tu, F.C. Wu, Effects of Se on the uptake of essential elements in *Pteris vittata* L, *Plant Soil.* 325 (2009) 123-132.
- [26] P.J. White, H.C. Bowen, P. Parmaguru, M. Fritz, W.P. Spracklen, R.E. Spiby, M.C. Meacham, A. Mead, M. Harriman, L.J. Trueman, B.M. Smith, B. Thomas, M.R. Broadley, Interactions between selenium and sulphur nutrition in *Arabidopsis thaliana*, *J. Exp. Bot.* 55 (2004) 1927-1937.
- [27] P.H. Masscheleyn, R.D. Delaune, W.H. Patrick Jr, Transformations of selenium as affected by sediment oxidation-reduction potential and pH, *Environ. Sci. Technol.* 24 (1990) 91-96.

- [28] L. Martin, D.L. Naftz, H.W. Lowham, J.G. Rankl, Cumulative potential hydrologic impacts of surface coal mining in the eastern Powder River structural basin, northeastern Wyoming. U. S. Geological Survey, Water Resources Investigations Report 884046. Prepared in cooperation with WDEQ and OSM. Cheyenne, Wyoming, 1988.
- [29] D.L. Naftz, J.A. Rice, Geochemical processes controlling selenium in ground water after mining, Powder River Basin, Applied Geochemistry, Wyoming, 1989, 565-575.
- [30] M.P. Arvy, M. Thiersault, P. Doireau, Relationship between selenium, micronutrients, carbohydrates, and alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* cells, *J. Plant. Nutr.* 18 (1995) 1535-1546.
- [31] A. Fargašová, J. Pastierová, K. Svetková, Effect of Se-metal pair combinations (Cd, Zn, Cu, Pb) on photosynthetic pigments production and metal accumulation in *Sinapis alba* L. seedlings, *Plant, Soil Environ.* 52 (2006) 8-15.
- [32] C. B'Hymer, J.A. Caruso, Selenium speciation analysis using inductively coupled plasma-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1114 (2006) 1-20.
- [33] Z. Mester, S. Willie, L. Yang, R. Sturgeon, J.A. Caruso, M.L. Fernandez, P. Fodor, R.J. Goldschmidt, H. Goenaga-Infante, R. Lobinski, P. Maxwell, S. McSheehy, A. Polatajko, B.B.M. Sadi, A. Sanz-Medel, C. Scriver, J. Szpunar, R. Wahlen, W. Wolf, Certification of a new selenized yeast reference material (SELM-1) for methionine, selenomethionine and total selenium content and its use in an intercomparison exercise for quantifying these analytes, *Anal. Bioanal. Chem.* 385 (2006) 168-180.
- [34] H. Hartikainen, T.L. Xue, V. Piironen, Selenium as an anti-oxidant and pro-oxidant in ryegrass, *Plant Soil.* 225 (2000) 193-200.
- [35] P. Cartes, L. Gianfreda, M.L. Mora, Uptake of selenium and its antioxidant activity in ryegrass when applied as selenate and selenite forms, *Plant Soil.* 276 (2005) 359-367.
- [36] X.F. Wu, J. Lag, Selenium in Norwegian farmland soils, *Acta Agric. Scand.* 38(3) (1988) 271-276.
- [37] L. Wu, Z.Z. Huang, Selenium assimilation and nutrient element uptake in white clover and tall fescue under the influence of sulfate concentration and selenium tolerance of the plants, *J. Exp. Bot.* 43 (1992) 549-555.
- [38] M.P. De Souza, E.A.H. Pilon-Smits, N. Terry, The physiology and biochemistry of selenium volatilization by plants, in: I Raskin, BD Ensley (Eds.), *Phytoremediation of toxic metals: Using plants to clean up the environment*, Wiley-Interscience Publication, New York, 2000, pp. 171-190.
- [39] G.S. Smith, J.H. Watkinson, Selenium toxicity in perennial ryegrass and white clover, *New Phytol.* 97 (1984) 557-564.
- [40] M.P. De Souza, E.A.H. Pilon-Smits, C.M. Lytle, S. Hwang, J.Tai, T.S.U. Honma, L. Yeh, N. Terry, Rate-limiting steps in selenium assimilation and volatilization by Indian mustard, *Plant Physiol.* 117 (1998) 1487-1494.
- [41] A. Shrift, J.M. Ulrich, Transport of selenate and selenite into *Astragalus* roots, *Plant Physiol.* 44 (1969) 893-896.
- [42] A. Zayed, C.M. Lytle, N. Terry, Accumulation and volatilization of different chemical species of selenium by plants, *Planta.* 206 (1998) 284-292.
- [43] P.F. Bell, D.R. Parker, A.L. Page, Contrasting selenate sulfate interactions in selenium-accumulating and non accumulating plant-species, *Soil Sci. Soc. Am. J.* 56(6) (1992) 1818-1824.
- [44] M.Y. Hirai, T. Fujiwara, M. Awazuhara, T. Kimura, M. Noji, K. Saito, Global expression profiling of sulfur-starved Arabidopsis by DNA macroarray reveals the role of O-acetyl-L-serine as a general regulator of gene expression in response to sulfur nutrition, *Plant. J.* 33 (2003) 651-663.
- [45] A. Maruyama-Nakashita, E. Inoue, A. Watanabe-Takahashi, T. Yarnaya, H. Takahashi, Transcriptome profiling of sulfur-responsive genes in Arabidopsis reveals global effects of sulfur nutrition on multiple metabolic pathways, *Plant Physiol.* 132 (2003) 597-605.
- [46] H.D. Toler, C.S. Charron, C.E. Sams, W.R. Randle, Selenium increases sulfur uptake and regulates glucosinolate metabolism in rapid-cycling *Brassica oleracea*, *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 132 (2007) 14-19.
- [47] J.K. Pittman, Managing the manganese: molecular mechanisms of manganese transport and homeostasis, *New Phytol.* 167 (2005) 733-742.
- [48] J.L. Hall, Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance, *J. Exp. Bot.* 53 (2002) 1-11.
- [49] A. Metwally, V.I. Safronova, A.A. Belimov, K.J. Dietz, Genotypic variation of the response to cadmium toxicity in *Pisum sativum*, *J. Exp. Bot.* 56 (2005) 167-178.
- [50] M. Molnárová, A. Fargašová, Se (IV) phytotoxicity for monocotyledonae cereals (*Hordeum vulgare* L., *Triticum aestivum* L.) and dicotyledonae crops (*Sinapis alba* L., *Brassica napus* L.), *J. Hazard. Mater.* 172 (2009) 854-861.
- [51] Xiao-Zhang Yu, Ji-Dong Gu, Differences in uptake and translocation of selenite and selenite by the weeping willow and hybrid willow, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 15 (2008) 499-508.
- [52] L. Hua-Fen, S.P. McGrath, Z. Fang-Jie, Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenite or selenate, *New Phyt.* 178 (2008) 92-102.

ANEXO 2

**Selenium speciation in enriched wheat (*Triticum aestivum*)
by X-Ray Absorption Near Edge Spectroscopy**

B. Guerrero, M. Llugany and M. Valiente

To be submitted

Selenium speciation in enriched wheat (*Triticum aestivum*) by X-Ray Absorption Near Edge Spectroscopy

B. GUERRERO*¹, M. LLUGANY² & M. VALIENTE¹

¹Centre GTS, Department of Chemistry, UAB, 08193 Bellaterra (Barcelona), Spain,
bea.guerrero.lopez@gmail.com and manuel.valiente@uab.cat

²Laboratory of Plant Physiology, UAB, 08193 Bellaterra (Barcelona), Spain,
merce.llugany@uab.cat

* Corresponding author

Abstract

Selenium intake can benefit human health, in particular cardiovascular diseases and some carcinogenic processes. It is noteworthy that such benefits concern with the ingested chemical Se species. Wheat (*Triticum aestivum*) is considered as an important source of Se intake for human diet. In this work we carry out a hydroponic culture enriching wheat with Se supplied in the form of sodium selenate (Na₂SeO₄), sodium selenite (Na₂SeO₃) or both mixed species. X-Ray Absorption Near Edge Structure (XANES) was applied to determine Se speciation in wheat roots and shoots to better understand the Se enrichment process. We observed in the obtained spectra qualitative and quantitative differences between the different parts of the plant and Se enrichment treatments. XANES was successfully applied as a method to better understand the influence of Se speciation modification in plants.

Keywords

Selenium, wheat (*Triticum aestivum*), speciation, selenite, selenate, selenoaminoacids, synchrotron, XANES.

Introduction

It is known that selenium (Se) is an essential trace element that can benefit human health, in particular cardiovascular diseases and some carcinogenic processes. Se can form organic and inorganic compounds and can function as both an oxidant and reductant, so it can be found in oxidation states of the reduced (-2), elemental (0) and oxidized form (+4,+6). (1, 2) Selenite and selenate are the most common Se compounds in the aqueous environment, but in biological samples both inorganic and organic Se species can be found. (3)

The main human Se source is food because our organism is not able for selenoprotein synthesis, in particular cereals are one of the most important sources of Se to humans. Cereal croplands can be naturally Se rich or anthropogenically enriched by the artificially addition of inorganic Se. (4,5,6) The latter case is needed in crops where soils are not rich in Se and whose population is more vulnerable to suffer mineral deficiency diseases. Some plants are able to accumulate and transform Se into bioactive compounds, like wheat (*Triticum aestivum*). This species is, therefore, a good candidate for investigation of the Se compounds through the different wheat tissues to better understand the Se bioassimilation process following plant exposure. (7) Nowadays it is well-recognized that the particular physico-chemical form in which an element is present in a sample will determine the toxicity, the biological activity, the bioavailability and the environmental impact of the element. For that reason the topic “speciation” has raised an unusual interest in the last years in areas so diverse such as toxicology, nutrition, agricultural, medical, biochemical and environmental sciences. (1)

X-ray absorption spectroscopy (XAS) has been applied as a speciation tool in biological, agricultural and environmental research. (8,9) The absolute advantage of this technique in comparison with the traditional wet chemistry speciation methods is the absence of sample preparation steps and chemical treatment, therefore, you can avoid any possibility of modifying the sample speciation during the analytical process, hence the chemical environment of the element in study is not changed. (10) Concretely, the study is focused on the X-Ray Absorption Near Edge Structure (XANES) region. In this concern, we aim to the characterization of Se species applying XANES fingerprinting to assess the Se speciation in the enriched wheat. Concerning specifically plants, XANES is being used increasingly as a powerful tool for the determination of Se speciation, i.e. the study of the type and percentage composition of organic and inorganic Se compounds. It has been used to investigate the chemical form and distribution of Se in *Astragalus bisulcatus* (11,12), *Convolvulus arvensis* (13), *Stanleya pinnata* (14), broccoli (*Brassica oleracea*), Indian mustard (*Brassica juncea* L.), sugarbeet (*Beta vulgaris* L.), rice (*Oryza sativa* L.) (15) and onion (16). To our knowledge, this is the first report of quantitative Se speciation in wheat tissues by XANES. Here we present data on the Se total content and chemical form in wheat roots and shoots of three different hydroponic enrichment cultures (selenite, selenate and both species together) at two total Se concentration levels (1 and 10 μ M Se). The main objective of the study is to distinguish between the different Se species that can be found in Se enriched wheat by applying XANES, in particular in different parts of the plant, in order to establish an appropriate Se enrichment strategy concerning wheat biofortification process after agreement with direct speciation analysis.

Materials and Methods

Hydroponic culture. *Triticum aestivum* cv. Pinzón (Semillas Fitó S.A., Spain) was used in this study as soft wheat well-known for its high flour quality. Before starting the hydroponics culture, seeds were germinated on moist filter paper for 3 days in an incubator at 25°C. Seedlings were then transferred to 1 L plastic pots and were allowed to acclimate and grow for a week with ¼ strength Hoagland's nutrient solution. Afterwards plants were exposed to 5 days-long under different Se supplementation treatments.

The composition of the nutrient solution was: 1.0 mM KNO₃, 1.0 mM Ca(NO₃)₂, 0.25 mM MgSO₄, 0.5 mM K₂HPO₄, 2.0 µM MnCl₂, 3 µM H₃BO₃, 0.1 µM (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 2µM ZnSO₄, 1 µM CuSO₄ and 60 µM FeNa-EDTA. The pH of this solution was buffered at 6.0 with 2 mM MES (2-morpholinoethanesulphonic acid, pH adjusted with KOH). The solution was aerated continuously and renewed twice in the middle of growth period. The culture was carried out in a controlled culture chamber with the following conditions: a photoperiod of 16 h day/8 h night, a temperature of 24 °C day/18 °C night and a light intensity of 320 µE m⁻² s⁻¹.

Se enrichment. Enrichment treatments were done by adding Se to the nutrient solution cultures in the form of sodium selenite (Na₂SeO₃·5H₂O, Fluka) and sodium selenate (Na₂SeO₄, Fluka) separately at two different Se concentrations: 1µM and 10µM Se. Previous results had shown toxicity symptoms at concentrations above 10µM. Therefore, the present study is only based on Se speciation below the toxic concentration levels. Additionally, the same Se total concentrations levels were reached by mixing both Se species at equal quantities. These treatments with mixed species are abbreviated as 0.5+0.5 and 5+5.

Sample preparation. After 5 days of incubation in Se enriched media, plants were harvested and roots desorbed with CaCl_2 solution to remove Se in root apoplast. After desorption, plants were rinsed with distilled water, divided into shoots and roots, frozen into liquid nitrogen and then lyophilized. Finally, root and shoot samples were homogenized in a mortar and converted into pellets by hydraulic pressure to be analyzed at the experimental station of the synchrotron facility.

Total Se determination. Wheat shoots and roots samples were digested in a microwave oven (Mars 5, CEM, USA) equipped with HP500 PFA vessels (CEM, USA) with 2 mL of 70% HNO_3 and 2 mL of MilliQ water under the EPA 3052 microwave oven method. The obtained digested solution was filtered, properly diluted with MilliQ water and analyzed to determine total Se concentration in an ICP-MS (PQExCell, Thermo Elemental, UK). A standard solution of 1000 mg L^{-1} of Se purchased from Aldrich (USA) was used for the calibration procedure and further dilutions were made with Milli-Q water.

X-Ray Absorption Spectroscopy. The XANES experiments were carried out at the beamline C of HASYLAB (Hamburg, Germany) running at 4.45 GeV with electron currents up to 120 mA. The incident beam desired energy is selected by a fixed exit Si(111) double crystal monochromator. The photon absorption of Se was recorded at the edge energy for its K line at 12658 eV, and its $K_{\alpha 1}$ 11224 eV and $K_{\alpha 2}$ 12497 eV fluorescent line intensities were measured in fluorescence mode. All XANES spectra were collected at room temperature. The selection of the detection mode depends upon the sample concentration and the matrix background (17). Therefore, pure reference compounds diluted in cellulose were analyzed in transmittance mode, while fluorescence detection mode was used for the analysis of Se diluted wheat root and shoot samples.

The XAS data were averaged (3-5 scans), normalized and background subtracted using Sixpack software package (¹⁸). Quantitative selenium speciation data were obtained by principal component analysis and linear least-squares fitting of the spectra from reference compounds, including sodium selenite ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Fluka) and sodium selenate (Na_2SeO_4 , Fluka) as inorganic Se compounds, whilst Selenomethionine (SeMet, Across Organics) and Selenocystine (SeCy, Sigma Aldrich) were modeled as organic selenoaminoacids. Nowadays, the least-squares fitting is widely accepted as a valid method for the speciation of complex biological samples (¹⁹). To examine the sample composition as a linear combination of standard components various fittings of Se reference compounds were calculated repeating the process until no more significant components could be identified and the sum of all components was equal to 100% ($\pm 15\%$). The relative quality of the fit was quantified by the residual value, a measure of how close the fit is to the data based on a sum of squares determination of the fractional misfit defined as follows:

$$R = \sum \frac{(x_{fit} - x_{data})^2}{(x_{data})^2}$$

Additionally, fitting procedure accuracy and sensitivity were evaluated by the analysis of synthetic samples and the certified reference material SELM-1 (Selenium Enriched Yeast Certified Reference Material, NRC, Canada).

Results and Discussion

Selenium reference compounds. Figure 1 shows the Se K near-edge spectra for pure selenium reference compounds of SeCy, SeMet, selenite and selenate. As expected, a shift position of the edge features to higher energies as Se becomes more oxidized. The obtained spectra of SeMet and SeMeSeCys (data not shown) are very similar mainly due to the similar local structure around selenium in both amino acids ($\text{H}_3\text{CSeCH}_2\text{R}$). The same similarity is reported by Thavarajah et.al. in a study of selenium speciation in lentils (20). Principal component analysis results indicated that the set of spectra from each sample require four main components. Therefore, in the present study organic selenium is modeled as SeMet and SeCy and inorganic selenium as selenate and selenite, all considered the major selenium forms present in wheat hydroponically enriched samples.

Method validation. In Figure 2 it is shown a comparison between the Se K-edge spectrum of SeMet and the certified reference material SELM-1. Applying the same quantitative data analysis procedure as for wheat samples, the compositional result for SeMet content in SELM-1 is 100% with a residual value corresponding to the quality of the fit of 0.07. Thus, the result is in agreement with the selenium composition of SELM-1 and the accuracy and sensitivity of the method can be considered evaluated.

Synthetic samples containing the selenium studied species were analyzed to evaluate the performance of the developed analytical method. As shown in spectra from Figure 3 and quantitative selenium speciation on Figure 4, the experimental fit and quantitative results are in accordance with the theoretical values.

Additionally, multiple scans of each sample were performed to confirm the measurement reproducibility and check possible oxidation state alterations or species degradation during the analysis. All the analyzed samples do not show edge shifts or

changes in the replicated spectra during the measuring time. Therefore, it is proved that the chemical state of the samples remained unchanged during the measurements.

Selenium enriched wheat samples. As can be seen in Figure 5 the proportion of inorganic to amino acid selenium in wheat samples is dependent, not only, on the part of the plant analyzed, but also, on the form of the selenium initially supplied hydroponically. It is noteworthy that the low selenium concentrations in wheat are considered challenging for XAS analysis. That could explain that spectra from 1 μ M selenium concentration treatments are noisier than those for the 10 μ M enrichments (Figure 6).

Concerning selenite enrichment treatments, although it is observed the same selenium speciation distribution proportion in shoots and roots samples, the overall total selenium concentration is higher in the plant root, this is in accordance with Mounicou et.al. results in the selenite enriched *Brassica Juncea*, a selenium enriched accumulator plant (21). As expected in the selenite fortification, no selenate is present in any part of the plant, so it basically reduces selenite to organoselenium compounds as SeMet and SeCy, being the latest the major selenocompound in this case.

For selenate enrichment treatments a small percentage of selenium remains as selenite (1-5%), i.e. a significant percentage of selenate is not metabolized (27-50%) but the metabolized amount is easily reduced to the corresponding organic selenium compounds as SeCy and SeMet. As for the selenite enrichments SeCy is the major selenoaminoacid, in the case of selenate enrichments it is the minor, being SeMet the predominant form.

In the case of mixed selenite and selenate treatments results show that the amount of inorganic selenium is higher in shoots compared with roots. On the other hand, looking at the organoselenium content, selenium is mainly accumulated in both roots and shoots as SeCy except in 10 μ M enriched roots where a small percentage of SeMet is present.

Concerning Se biofortification, it is noteworthy that we are looking for Se enrichment procedures that mainly accumulate organic selenium forms in shoots, so shoots are the first stage of wheat growth and they will determine the Se wheat content that is going to be used for the manufacture of Se enriched products. Comparing all selenium enrichment treatments (Figure 7), enriching with selenate we obtain the lower selenium organic content in shoots, on the other hand, the selenite one accumulates a higher organic selenium content in shoots. In mixture treatments the selenium total organic content in shoots is higher than in selenate though slightly lower than in selenite. To conclude, results have shown that the best way to anthropogenically enrich selenium in order to obtain a higher organic selenium content in shoots and no toxicity symptoms is mixing both selenite and selenate species at equal concentrations (5 μ M Se as selenite and 5 μ M Se as selenate). However, it should be emphasized that wheat was grown in hydroponic culture, but in soil conditions, Se behaviour could be different due to the presence of other compounds and the metal-soil interactions, so further studies will be necessary to elucidate wheat response under real soil growth conditions.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (Project CTQ2009-07432).

FIGURES

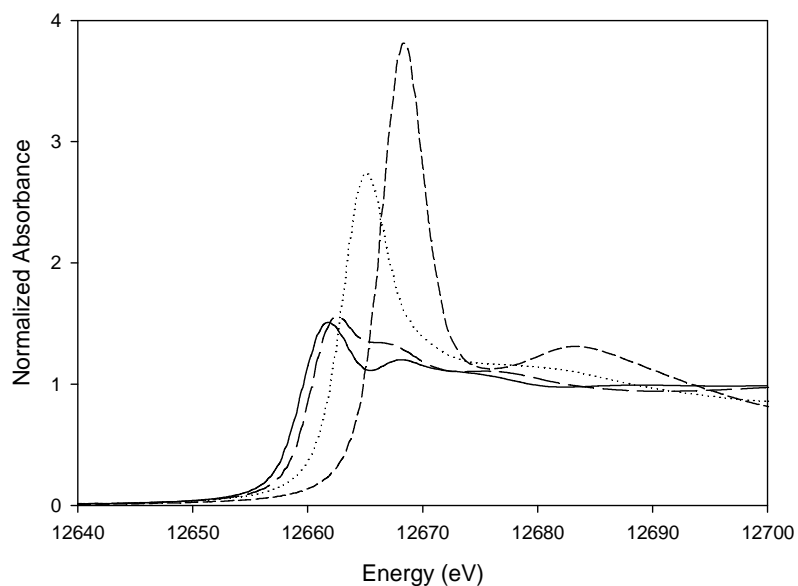


Figure 1. Se XANES spectra for reference compounds (solid line SeCy, long dashed line SeMet, dotted line SeO₃²⁻ and short dashed line SeO₄²⁻).

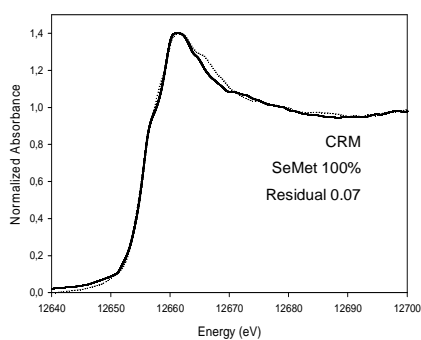


Figure 2. Linear combination fit of the SELM-1 CRM (solid line raw data, dotted line fit).

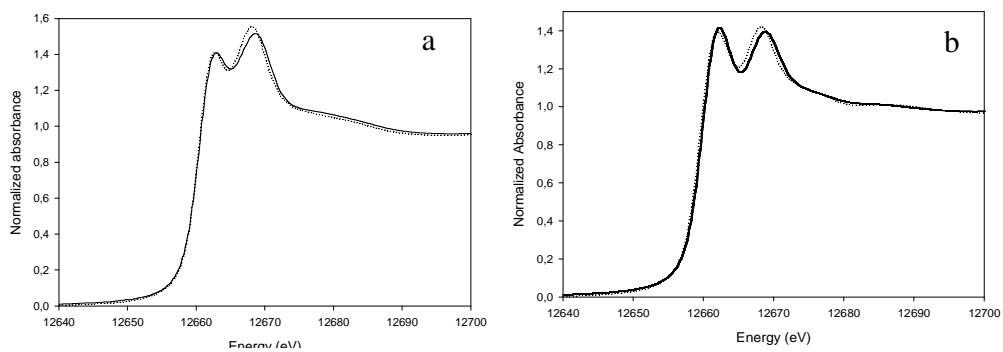


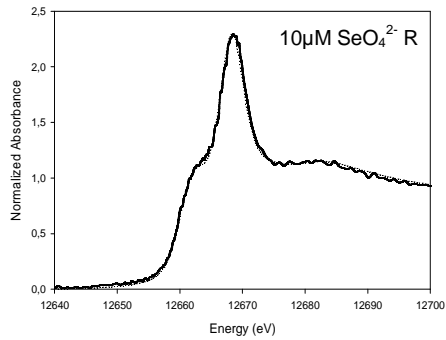
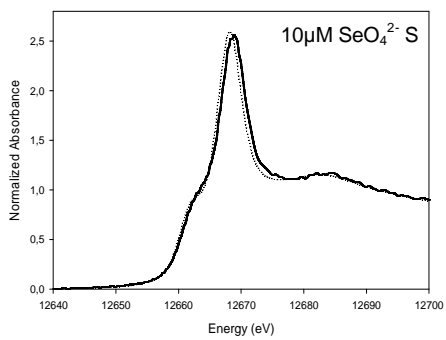
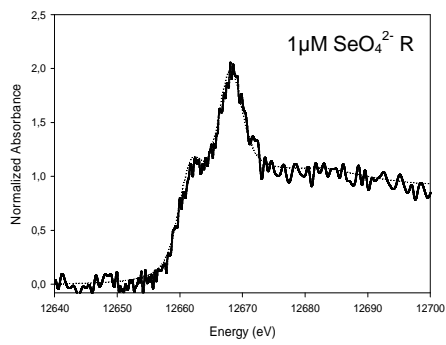
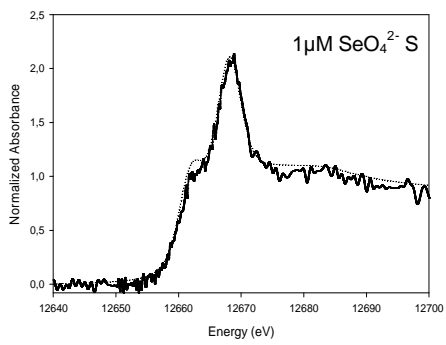
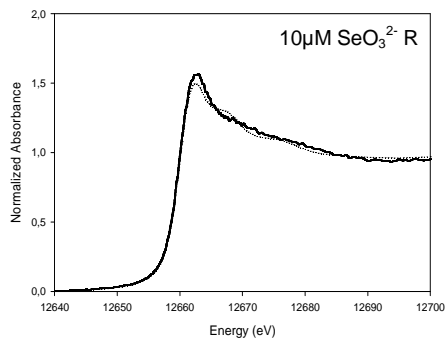
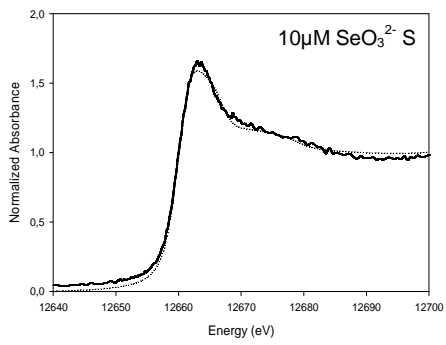
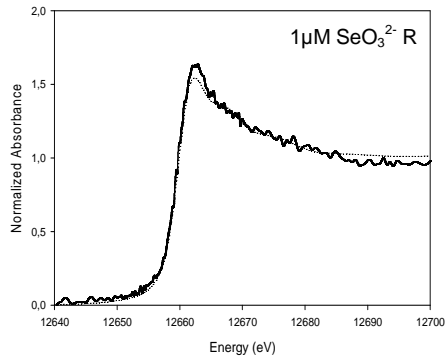
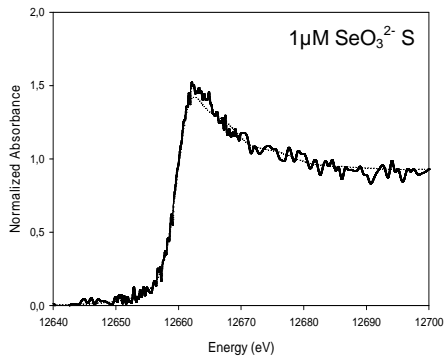
Figure 3. Linear combination fit of synthetic samples (solid line raw data, dotted line fit): SeMet rich (a) and SeCy rich (b).

Selenium components	Theoretical composition (%)	Experimental composition (%)	Residual	Sum (%)
SeMet rich synthetic sample (Fig. Xa)				
SeO ₃ ²⁻	10	7.0		
SeO ₄ ²⁻	10	8.6		
SeMet	70	71.6	0.05	99.0
SeCy	10	11.8		
SeCy rich synthetic sample (Fig. Xb)				
SeO ₃ ²⁻	10	7.2		
SeO ₄ ²⁻	10	5.4		
SeMet	20	27.0	0.07	99.1
SeCy	60	59.5		

Figure 4. Linear combination fit results of synthetic samples A and B. Theoretical and experimental composition raw quantitative results in percentage, residual values corresponding to the quality of the fit and sums of components for each sample.

	Composition (%)				Sum (%)	Residual
	SeO ₃ ²⁻	SeO ₄ ²⁻	SeCy	SeMet		
1μM SeO ₃ ²⁻ S	11,3	0,0	60,5	24,5	96,3	0,17
1μM SeO ₃ ²⁻ R	9,7	0,0	70,7	24,1	104,5	0,17
10μM SeO ₃ ²⁻ S	16,8	0,0	55,8	35,4	108,0	0,16
10μM SeO ₃ ²⁻ R	6,9	0,0	50,8	42,3	100,0	0,07
1μM SeO ₄ ²⁻ S	0,0	32,5	5,7	61,9	100,1	0,49
1μM SeO ₄ ²⁻ R	0,0	27,9	15,9	56,2	100,0	0,54
10μM SeO ₄ ²⁻ S	0,5	50,9	0,0	48,6	100,0	0,21
10μM SeO ₄ ²⁻ R	4,9	38,2	27,9	32,3	103,3	0,07
1μM mixture S	24,9	8,1	81,5	0,0	114,5	0,63
1μM mixture R	7,5	2,4	98,3	0,0	108,2	0,75
10μM mixture S	17,5	12,3	75,4	0,0	105,2	0,32
10μM mixture R	9,0	2,0	73,6	15,3	99,9	0,08

Figure 5. Linear combination fit results of the samples (R=root, S=shoot). Raw quantitative compositional results in percentage, sums of components for each sample and residual values corresponding to the quality of the fit.



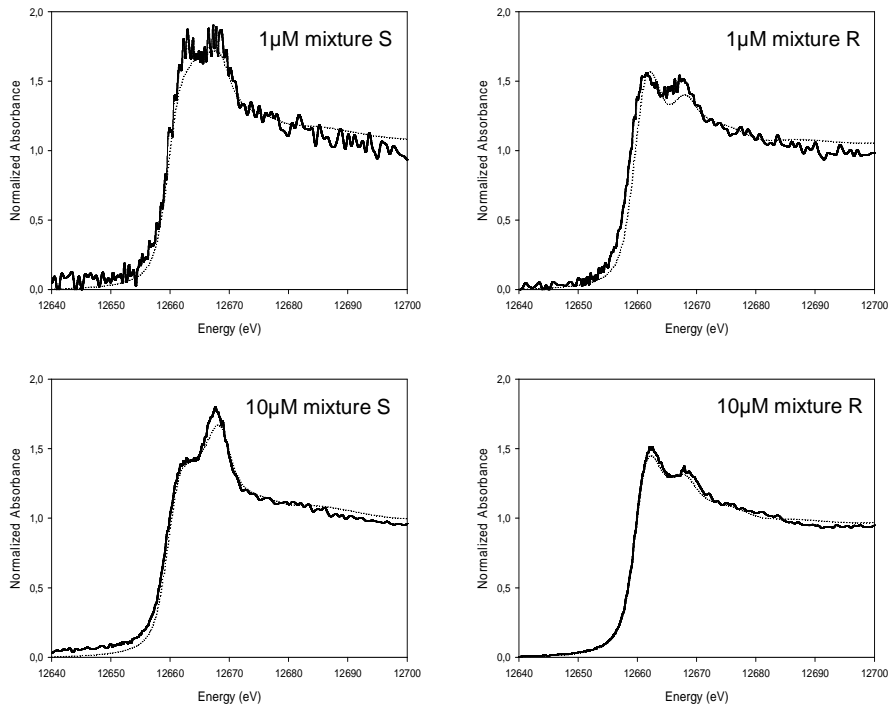


Figure 6. Linear combination fits of the samples (solid line raw data, dotted line fit).

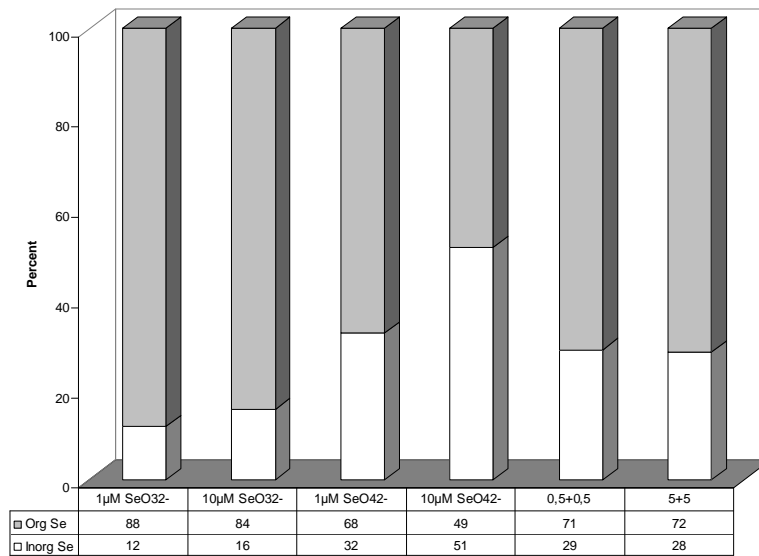


Figure 7. Total organic and inorganic Se distribution in shoots normalized to percentage.

REFERENCES

1. Polatajko, A.; Jakubowski, N.; Szpunar, J. State of the art report of selenium speciation in biological samples. *J. Anal. At. Spectrom.* **2006**, 21 (7), 639-654.
2. Clark, L.C.; Combs, G.F.; Turnbull, B.W.; Slate, E.H.; Chalker, D.K.; Chow, J.; Davis, L.S.; Glover, R.A.; Graham, G.F.; Gross, E.G.; Krongrad, A.; Leshner, J.L.; Park, H.K.; Sanders, B.B.; Smith, C.L.; Taylor, J.R. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. *J. Am. Med. Assoc.* **1996**, 276, 1957-1963.
3. Muñoz Olivas, R.; Donard, O.F.X.; Camara, C.; Quevauviller, P. Analytical techniques applied to the speciation of selenium in environmental matrices. *Anal. Chim. Acta.* **1994**, 286, 357-370.
4. Lyons, G.; Stangoulis, J.; Graham, R. High-selenium wheat: biofortification for better health. *Nutr. Res. Rev.* 2003, 16, 45-60.
5. Hawkesford, M.J.; Zhao, F.J. Strategies for increasing the selenium content of wheat. *J. Cereal Sci.* **2007**, 46 (3), 282-292.
6. Navarro-Alarcon, M.; Cabrera-Vique, C. Selenium in food and the human body: A review. *Sci. Total Environ.* **2008**, 400, 115-141.
7. Terry, N.; Zayed, A.M.; de Souza, M.P.; Tarun, A.S. Selenium in Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **2000**, 51, 401-432.
8. Prange, A.; Modrow, H. X-Ray absorption spectroscopy and its application in biological, agricultural and environmental research. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technol.* **2002**, 1, 259-276.
9. Lombi, E.; Susini, J. Synchrotron-based techniques for plant and soil science: opportunities, challenges and future perspectives. *Plant Soil.* **2009**, 320, 1-35.
10. Feldmann, J. What can the different current detection methods offer for element speciation? *Trends Anal. Chem.* **2005**, 24 (3), 228-242.
11. Pickering, I.J.; Wright, C.; Bubner, B.; Ellis, D.; Persans, M.W.; Yu, E.Y.; George, G.N.; Prince, R.C.; Salt, D.E. Chemical form and distribution of selenium and sulfur in the selenium hyperaccumulator *Astragalus bisulcatus*. *Plant Physiol.* **2003**, 131, 1460-1467.
12. Pickering, I.J.; Prince, R.C.; Salt, D.E.; George, G.N. Quantitative, chemically specific imaging of selenium transformation in plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2000**, 97 (20), 10717-10722.
13. Cruz-Jimenez, G.; Peralta-Videa, J.R.; de la Rosa, G.; Meitzner, G.; Parsons, J.G.; Gardea-Torresdey, J.L. Effect of sulfate on selenium uptake and chemical speciation in *Convolvulus arvensis*. *L. Environ. Chem.* **2005**, 2, 100-107.
14. Freeman, J.L.; Zhang, L.H.; Marcus, M.A.; Fakra, S.; McGrath, S.P.; Pilon-Smits, E.A.H. Spatial imaging, speciation, and quantification of selenium in the hyperaccumulator plants *Astragalus bisulcatus* and *Stanleya pinnata*. *Plant Physiol.* **2006**, 142, 124-134.
15. Zayed, A.; Lytle, M.; Terry, N. Accumulation and volatilization of different chemical species of selenium by plants. *Planta.* **1998**, 206 (2), 284-292.

-
16. Bulska, E.; Wysocka, I.A.; Wierzbicka, M.H.; Proost, K.; Janssens, K.; Falkenberg, G. In vivo investigation of the distribution and the local speciation of selenium in *Allium cepa* L. by means of microscopic X-ray absorption near-edge structure spectroscopy and confocal microscopic X-ray fluorescence analysis. *Anal. Chem.* **2006**, 78 (22), 7616-7624.
 17. Koningsberger, D.C.; Prins, R. X-ray absorption. Wiley, New York, 1988.
 18. Webb, S. M. A graphical user interface for XAS analysis using IFEFFIT. *Phys. Scr.* **2005**, T115, 1011-1014.
 19. Pickering, I.J.; Brown, G.E., Jr.; Tokunaga, T.K. Quantitative speciation of selenium in soils using X-ray absorption spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* **1995**, 20, 610-613.
 20. Thavarajah, D; Vandenberg A.; Graham, N.G.; Pickering I.J. Chemical form of selenium in naturally selenium-rich lentils (*Lens culinaris* L.) from Saskatchewan. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 7337-7341.
 21. Mounicou, S.; Vonderheide, A.P.; Shann, J.R.; Caruso, J.A. Comparing a selenium accumulator plant (*Brassica juncea*) to a nonaccumulator plant (*Helianthus annuus*) to investigate selenium-containing proteins. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, 386, 1367-1378.

ANEXO 3

METHOD TO ENRICH PLANT SELENOAMINOACIDS BY CHEMICAL TUNNING

B. Guerrero, M. Llugany and M. Valiente

EP Patent application number EP13172305.8

UK Patent application number 1310753.7

Application date 17/06/2013

Acknowledgement of receipt

We hereby acknowledge receipt of your request for grant of a European patent as follows:

Submission number	2176030	
Application number	EP13172305.8	
File No. to be used for priority declarations	EP13172305	
Date of receipt	17 June 2013	
Your reference	T-2013-015EP	
Applicant	UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA	
Country	ES	
Title	Method to enrich plant selenoaminoacids by chemical tuning	
Documents submitted	package-data.xml application-body.xml OLF-ARCHIVE.zip\PreConv.zip SPECEPO-3.pdfAbstract.pdf (1 p.) SPECEPO-1.pdfDescription.pdf (26 p.) f1002-2.pdf (1 p.) feesheetint.pdf (1 p.)	ep-request.xml ep-request.pdf (4 p.) SPECEPO-2.pdfClaims.pdf (2 p.) SPECEPO-4.pdfFigures.pdf (2 p.) f1002-1.pdf (1 p.) f1002-3.pdf (1 p.)
Submitted by	CN=X. Sanchez-Vallvé 24825,O=Universitat Autònoma de Barcelona,C=ES	
Method of submission	Online	

Date and time
receipt generated

17 June 2013, 15:39 (CEST)

Message Digest

C4:02:51:54:22:DF:CA:6A:42:E0:46:44:BA:BE:69:AB:18:E1:D0:E9

Correction by the EPO of errors in debit instructions filed by eOLF

Errors in debit instructions filed by eOLF that are caused by the editing of Form 1038E entries or the continued use of outdated software (all forms) may be corrected automatically by the EPO, leaving the payment date unchanged (see decision T 152/82, OJ EPO 1984, 301 and point 6.3 ff ADA, Supplement to OJ EPO 10/2007).

/European Patent Office/



**INTELLECTUAL
PROPERTY OFFICE**

Concept House
Cardiff Road
South Wales
NP10 8QQ
United Kingdom

Electronic Filing Receipt

Telephone +44 (0) 1633 814000
Minicom +44 (0) 8459 222250

DX 722540/41 Cleppa Park 3

Website www.ipo.gov.uk

UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA
Edifici A
Campus universitari s/n
Bellaterra (Cerdanyola del Valles)
Spain
08193

Your Ref: T-2013-015GB

17 June 2013

PATENT APPLICATION NUMBER 1310753.7

We have received your request for grant of a patent and recorded its details as follows:

Filing date(*)	17 June 2013	
Earliest priority date (if any)		
Applicant(s) / contact point	UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA	
Application fee paid	Yes	
Description (number of pages or reference)	26	
Certified copy of referenced application	Not applicable	
If description not filed	Not applicable	
Claims (number of pages)	2	
Drawings (number of pages)	2	
Abstract (number of pages)	1	
Statement of inventorship (Form 7)	Yes	
Request for search (Form 9A)	Yes	
Request for examination (Form 10)	Yes	
Priority Documents	None	
Other Attachments Received	Pre-conversion archive	PreConv.zip
	Fee Sheet	FeeSheet.pdf

	Validation Log	ValidLog.pdf
Signed by	CN=X. Sanchez-Vallvé 24825,O=Universitat Autònoma de Barcelona,C=ES	
Submitted by	CN=X. Sanchez-Vallvé 24825, O=Universitat Autònoma de Barcelona, C=ES	
Timestamp of Receipt	17 June 2013, 15:08:00 (BST)	
Digest of Submission	A1:23:B8:C2:D2:37:0F:14:3C:F5:9D:77:1D:2A:7D:09:74:AF:C8:D3	
Received	/Intellectual Property Office, Newport/	

Please quote the application number in the heading whenever you contact us about this application.

If you have any queries about the accuracy of this receipt, please phone Christine Davis on +44 (0) 1633 814570. For all other queries, please phone our Central Enquiry Unit on 08459 500 505 if you are calling from the UK, or +44 (0) 1633 813930 if you are calling from outside the UK. Or e-mail enquiries@ipo.gov.uk

* This date is provisional. We may have to change it if we find during preliminary examination that the application does not satisfy section 15(1) of the Patents Act 1977 or if we re-date the application to the date when we get any later filed documents.

METHOD TO ENRICH PLANT SELENOAMINOACIDS BY CHEMICAL

TUNNING

DESCRIPTION

TECHNICAL FIELD

The present invention relates to a method to control the enrichment of plants and particularly wheat plants in organic selenium, particularly selenomethionine (SeMet), selenocysteine (SeCyst) or a mixture of both, wherein the plant is fed with a nutrient solution enriched with at least one of sodium selenite and sodium selenate at a controlled molar ratio that produces corresponding SeMet/SeCyst ratio, leading thus to a selective selenoaminoacid production by varying the indicated Selenite/Selenate molar ratio (chemical tuning), regulation that can be expressed in terms of the related redox potential of the nutritional solution to produce enriched plants in organic selenium using this method, and to products obtained from this cereal plant.

BACKGROUND ART

Selenium (Se) is an essential trace element for animals mainly due to its presence in several vital enzymes, such as glutathione peroxidase (Deagen, Beilstein and Whanger 1991; Deagen et al. 1993; Polatajko, Jakubowski and Szpunar 2006). Its biological importance and its putative anticancer activity (Clark et al. 1996) or cardiovascular preventive action (S. Stranges et al., 2006) have resulted in the popularity of food supplements, usually based on selenite, selenomethionine or selenized yeast (Navarro-Alarcon and Cabrera-Vique 2008; Rayman 2004; Schrauzer 2001). The narrow margin between toxicity, essentiality and deficiency grows up the interest in Se because of both health and environmental impacts as relatively high Se concentrations in soils or waters represent a threat for the environment (Pyrzynska 2002).

The most important human source of Se is food; therefore plants play an important role in Se supplementation (Finley 2005). Plants synthesize selenoproteins from Se containing soils; hence Se content of crops depends on quality of soil Se richness. It is therefore important to

better understand Se bioassimilation processes, changes in growth parameters and nutrient uptake in correlation with Se uptake and translocation in plants.

Cereal grains are poor sources of key mineral nutrients. As a result, the world's poorest people, generally those subsisting on a monotonous cereal diet, are also those most vulnerable to mineral deficiency diseases. We selected wheat in our study because this cereal and its products, for instance, breads, cakes, cereals and pasta, are an important source of Se intake for human diet (Lyons, Stangoulis and Graham 2003; Hawkesford and Zhao 2007). Wheat is a non-Se-accumulator plant and the threshold Se-toxicity concentration is dependent on the form of Se accumulated (Terry et al. 2000). On the other hand, Se concentration in wheat shows great variations between countries and regions (Hawkesford and Zhao 2007; Zhu et al. 2009). In this concern, the information about Se speciation in enriched wheat will be of key importance to understand the role of this element on the observed health benefits. Nowadays, it is well-recognized that the particular physico-chemical form of an element present in a sample will determine the toxicity, the biological activity, the bioavailability and the environmental impact of this element (Polatajko et al. 2006). To date, the mechanism of selenate uptake by plants has been already reported, however little is known of selenite related behaviour (Arvy 1993; Ellis and Salt 2003; Hopper and Parker 1999; Li, McGrath and Zhao 2007).

With respect to Se determination in plant samples and hydroponic solutions, ICP-MS has been applied as one of the most powerful tools for trace level concentration analysis in environmental and biological samples. Due to the interference of Ar dimmer ions in Se determination, we have used an ICP-MS instrument equipped with a collision cell, thus been able to remove spectral interferences by pressurizing the cell chamber with inert or reacting gases (Tanner, Baranov and Bandura 2002), i.e., the use of H₂ in the case of our study. The approach for total Se determination in biological samples by ICP-MS with H₂ gas in collision cells has been already reported (Huerta et al. 2003; Montes-Bayón et al. 2006; Wilburn et al. 2004).

On the other hand, there is a lack of knowledge with respect to the influence of the physicochemical parameters of the cultivation media on the finally produced selenoaminoacids by the enriched plant. A proper solution of this gap of knowledge will contribute to overcome two main important issues in organic selenium enrichment: 1) the variation of organic selenium quality due to both selenium content in the cultivation media and seasonality of such production. 2) to

determine production conditions for a selected quality of organic selenium, i.e., specific relationship SeMet/SeCyst for a given application or disease prevention.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention relates to a method to control the enrichment of plants and particularly wheat plants in organic selenium, particularly selenomethionine (SeMet), selenocysteine (SeCyst) or a mixture of both, wherein the plant is fed with a nutrient solution enriched with at least one of selenium salt, such as sodium selenite and sodium selenate at a controlled molar ratio that produces corresponding SeMet/SeCyst ratio, leading thus to a selective selenoaminoacid production by varying the indicated Selenite/Selenate molar ratio (chemical tuning), regulation that can be expressed in terms of the related redox potential of the nutritional solution to produce enriched plants in organic selenium using this method, and to products obtained from this cereal plant.

In this work, the inventors have carried out an enrichment of wheat plants with Se supplied in the form of selenium salts, such as sodium selenate, sodium selenite or a mixture of both.

One of the objectives of the present study includes not only the assimilation of Se but also its effect on the micro and macronutrient uptake in each part of the plant (roots and shoots). In addition, we study effects of Se supplementation on growth parameters. Although, there are some studies about the effect of Se on the uptake of other essential elements in plants, the interaction between Se and essential nutrients is not still well understood (Arvy et al. 1995; Fargašová et al. 2006; Feng et al. 2009).

In its first embodiment, the invention is directed to a method to enrich plants in organic selenium, particularly in selenomethionine, selenocysteine or a mixture of both, wherein the cereal plant is fed with a nutrient solution comprising at least one selenium salt at a total selenium concentration less than 100 μ M having a redox potential between -0.2 and 0.95 volts (minus 0.2 and plus 0.95 volts) and a pH varying between 5.0 and 9.0.

In a second aspect, the invention is directed to a method to enrich plants in organic selenium, particularly in selenomethionine, selenocysteine or a mixture of both, wherein the plant is fed with a nutrient solution comprising at least one of sodium selenite (Na₂SeO₃·5H₂O) and

sodium selenate (Na₂SeO₄) at a total selenium concentration less than 100 μ M having a redox potential between -0.2 and 0.95 volts (minus 0.2 and plus 0.95 volts) and a pH varying between 5.0 and 9.0.

In a third aspect, the invention is directed to cereal plants, particularly wheat plants, enriched in organic selenium using the method of the invention.

In a fourth aspect, the invention is directed to cereal products obtained from the cereal plants enriched in organic selenium using the method of the invention.

The invention is based on the fact that the inventors have found that, when a cereal plant such as a wheat is fed with a nutrient solution comprising at least one of sodium selenite (Na₂SeO₃·5H₂O) and sodium selenate (Na₂SeO₄) having a total selenium concentration less than 100 μ M having a redox potential between -0.2 and +0.95 volts, the plant is enriched in organic selenium, particularly selenomethionine, selenocysteine or a mixture of both. The enrichment is more accrued in the plant shoots rather than in the roots. The inventors have also found out a relationship between the redox conditions of the nutrient solution comprising the selenite and/or selenate and the predominant selenoaminoacid obtained. This finding provides a way to chemically tune the conditions for specific selenoaminoacids production. This aspect is based on the obtained results of this invention that reveal that the variation of Selenite/Selenate ratio produces a significant effect on the nature of aminoacids obtained. Additionally, according to this invention it is possible to observe how the production of Selenomethionine increases in favor of Selenocysteine when the Selenite/Selenate ratio decreases. This effect correlates the redox conditions of the hydroponic solution provided by the Selenite/Selenate ratio with the observed redox behavior of the corresponding selenoaminoacids Selenocysteine and Selenomethionine observed at the XANES Spectra (Synchrotron technique) of this invention. This finding provides us a way to tune chemically the conditions for a specific selenoaminoacid production.

In one embodiment of the method to enrich cereal plants in organic selenium, the method comprises feeding the plant with a nutrient solution comprising about 10 μ M selenium as sodium selenite to obtain a higher proportion of selenocysteine than selenomethionine in the cereal shoots.

In other embodiment, the method comprises feeding the plant with a nutrient solution comprising about 10 μ M selenium as sodium selenate to obtain a higher proportion of selenomethionine than selenocysteine in the cereal shoots.

In another embodiment, the method comprises feeding the plant with a nutrient solution enriched with about 5 μ M selenium as sodium selenite and 5 μ M selenium as sodium selenate.

In an embodiment of the cereal plant enriched in organic selenium of the invention, the cereal plant can be wheat, maize, rice, barley, oat or sorghum. In an embodiment of the cereal product obtained from a cereal plant enriched with the method of the invention, the cereal product can be cereal grains, cereal flour or cereal stems

Brief description of the figures

Fig. 1. Selenium reference compounds. (REFERENCES SPECTRA): shows the Se K near-edge spectra for pure selenium reference compounds of SeCy, SeMet, selenite and selenate. As expected, a shift position of the edge features to higher energies as Se becomes more oxidized. The obtained spectra of SeMet and SeMeSeCys (data not shown) are very similar mainly due to the similar local structure around selenium in both amino acids (H₃CSeCH₂R). The same similarity is reported by Thavarajah et.al. in a study of selenium speciation in lentils (Thavarajah, D; Vandenberg A.; Graham, N.G.; Pickering I.J. Chemical form of selenium in naturally selenium-rich lentils (*Lens culinaris* L.) from Saskatchewan. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 7337-7341.). Principal component analysis results indicated that the set of spectra from each sample require four main components. Therefore, in the present study organic selenium is modeled as SeMet and SeCy and inorganic selenium as selenate and selenite, all considered the major selenium forms present in wheat hydroponically enriched samples.

Fig. 2. (CRM FIT SPECTRA): Shows a comparison between the Se K-edge spectrum of SeMet and the certified reference material SELM-1. Applying the same quantitative data analysis procedure as for wheat samples, the compositional result for SeMet content in SELM-1 is 100% with a residual value corresponding to the quality of the fit of 0.07. Thus, the result is in agreement with the selenium composition of SELM-1 and the accuracy and sensitivity of the method can be considered evaluated.

Figure 3. (SYNTHETIC SAMPLES SPECTRA): Shows quantitative selenium speciation on Table 1 (Synthetic samples results table), the experimental fit and quantitative results are in accordance with the theoretical values. Synthetic samples containing the selenium studied species were analyzed to evaluate the performance of the developed analytical method. Additionally, multiple scans of each sample were performed to confirm the measurement reproducibility and check possible oxidation state alterations or species degradation during the analysis. All the analyzed samples do not show edge shifts or changes in the replicated spectra during the measuring time. Therefore, it is proved that the chemical state of the samples remained unchanged during the measurements.

Table 1 shows linear combination fit results of synthetic samples A and B. Theoretical and experimental composition raw quantitative results in percentage, residual values corresponding to the quality of the fit and sums of components for each sample.

Selenium components	Theoretical composition (%)	Experimental composition (%)	Residual	Sum (%)
SeMet rich synthetic sample (Fig. Xa)				
SeO ₂	10	7.0		
SeO ₃	10	8.6	0.05	99.0
SeMet	70	71.6		
SeCy	10	11.8		
SeCy rich synthetic sample (Fig. Xb)				
SeO ₂	10	7.2		
SeO ₃	10	5.4	0.07	99.1
SeMet	20	27.0		
SeCy	60	59.5		

Table 1

EXAMPLES

The following examples illustrate the invention and should not be considered in a limitative sense thereof. The following examples have been carried out with following materials and methods:

Plant material and culture conditions

Triticum aestivum cv. Pinzón (Semillas Fitó S.A., Spain) was used in this study as soft wheat well-known for its high flour quality. Before starting the hydroponics culture, seeds were germinated on moist filter paper for 3 days in an incubator at 25°C. Seedlings were then transferred to 1 L plastic pots and were allowed to acclimate and grow for a week with ¼ strength Hoagland's nutrient solution. Afterwards plants were exposed to 5 days-long under different Se supplementation treatments.

The composition of the nutrient solution was: 1.0 mM KNO₃, 1.0 mM Ca(NO₃)₂, 0.25 mM MgSO₄, 0.5 mM K₂HPO₄, 2.0 μM MnCl₂, 3 μM H₃BO₃, 0.1 μM (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 2 μM ZnSO₄, 1 μM CuSO₄ and 60 μM FeNa-EDTA. The pH of this solution was buffered at 6.0 with 2 mM MES (2-morpholinoethanesulphonic acid, pH adjusted with KOH). The solution was aerated continuously and renewed twice in the middle of growth period. The culture was carried out in a controlled culture chamber with the following conditions: a photoperiod of 16 h day/8 h night, a temperature of 24°C day/18°C night and a light intensity of 320 μE m⁻² s⁻¹.

The relative availability of selenate and selenite in nutrient solutions depend on the presence of other competing ions (Hopper and Parker, 1999). Higher accumulation of Se in shoots in selenate enrichments compared with that of selenite is in agreement with results reported by Ellis and Salt (2003) where it was proposed that selenate readily competes with sulfate for uptake by plants and is probably assimilated actively by sulfur transport pathway in chloroplasts due to their chemical analogy. In our study, selenite in nutrient solution at pH 6.0 exists primarily as HSeO₃⁻ (Geochem, data not shown) and behaves as a weak acid that can compete with phosphate uptake. Other authors have proved that selenite uptake has a great passive component and a minor active one (Ulrich and Shrift, 1968; Broyer et al. 1972; Arvy, 1993; Hopper and Parker, 1999). The nutrient solution in most studies contains sulfate levels similar to those found in soil solution but phosphate concentrations are normally much higher (Asher and Edwards, 1983). On the other hand, Hopper and Parker (1999) demonstrated that the inhibition of sulfate by selenate is stronger than that of phosphate by selenite. Taking into account these findings in our experiments, levels of both nutrients have been lowered to avoid part of this competition, even though the selectivity of transporters varies between plant species and nutritional status (White et al. 2004).

Selenium enrichment

The enrichment treatments were done by adding Se to the nutrient solution cultures in the form of sodium selenite (Na₂SeO₃·5H₂O, Fluka) and sodium selenate (Na₂SeO₄, Fluka) separately at four different Se concentrations: 1 μM, 10 μM, 50 μM and 100 μM. Additionally, the same Se total concentrations levels were reached by mixing both Se species at equal quantities. These treatments with mixed species are abbreviated as 0.5+0.5, 5+5, 25+25 and 50+50.

Each plastic pot had three plants and each Se treatment was duplicated. It is noteworthy that plant roots and shoots, separately, from each pot were mixed together before digestion. In addition, the complete hydroponics culture experiment was done twice.

Sample preparation

After 5 days of incubation in Se enriched media, plants were harvested and roots desorbed with CaCl₂ solution to remove Se in root apoplast. After desorption, plants were rinsed with distilled water, divided into shoots and roots, frozen into liquid nitrogen and then lyophilised. Plants were weighted before and after lyophilisation in order to determine moisture content. Aliquots of nutrient solutions were taken for analysis of total Se and root elongation were measured to study the relative plant growth before and after Se enrichment.

Wheat shoots and roots samples were digested in a microwave oven (Mars 5, CEM, USA) equipped with HP500 PFA vessels (CEM, USA) with 2 mL of 70% HNO₃ and 2 mL of MilliQ water under the EPA 3052 microwave oven method. The obtained digested solution was filtered, properly diluted with MilliQ water and analysed to determine total Se concentration and other elements.

Total Se determination

Corresponding samples were analysed in an ICP-MS (PQExCell, Thermo Elemental, UK) in order to determine total Se concentration in each plant part after microwave acid digestion. A standard solution of 1000 mg L⁻¹ of Se purchased from Aldrich (USA) was used for the calibration procedure and further dilutions were made with Milli-Q water. A flow of 3 mL min⁻¹ of hydrogen was applied to pressurize the collision cell to be able to monitor ⁸⁰Se and ⁸²Se (B'Hymer and Caruso 2006). All Se isotopes were measured (⁷⁶, ⁷⁷, ⁷⁸, ⁸⁰, ⁸² and ⁸³) and the effect of Se was quantified and corrected by measuring a known solution of Br (⁷⁹Br and ⁸¹Br).

In the absence of wheat Se enriched reference materials available, SELM-1 CRM (Selenium Enriched Yeast Certified Reference Material, NRC, Canada) was analysed to test and validate the analytical methodology for total Se determination by ICP-MS. The SELM-1 CRM Se content analysed was 1980 ± 41 mg/kg (expressed as average \pm SD, $n=3$). That result is in reasonable agreement with the values determined by NRC during the production of this material (2059 ± 64 mg/kg) (Mester et al. 2006).

Nutrient elements determination

Wheat shoots and roots digested samples were analysed by ICP-OES (Optima 3200RL, Perkin Elmer, USA) to determine the concentration of macronutrients (Ca, K, Mg, P and S) and several micronutrients (Cu, Fe, Mn and Zn) in order to study the effect of Se addition on these elements uptake. Corresponding standard 1000 mg L⁻¹ solutions purchased from High Purity Standards (USA) were used for the calibration procedure.

Data analysis

Statistical analysis for comparison of means between different treatments was done by a two sample t-test at a significant level of 0.05 with SPSS software package. All results are expressed as means of 4 replicates with corresponding standard errors.

X-Ray Absorption Spectroscopy. The XANES experiments were carried out at the beamline C of HASYLAB (Hamburg, Germany) running at 4.45GeV with electron currents up to 120mA. The incident beam desired energy is selected by a fixed exit Si double crystal monochromator. The photon absorption of Se was recorded at the edge energy for its K line at 12658eV, and its K α 1 11224eV and K α 2 12497eV fluorescent line intensities were measured in fluorescence mode. All XANES spectra were collected at room temperature. The selection of the detection mode depends upon the sample concentration and the matrix background (Koningsberger, D.C.; Prins, R. X-ray absorption. Wiley, New York, 1988). Therefore, pure reference compounds diluted in cellulose were analyzed in transmittance mode, while fluorescence detection mode was used for the analysis of Se diluted wheat root and shoot samples.

The XAS data were averaged (3-5 scans), normalized and background subtracted using Sixpack software package (Webb, S. M. A graphical user interface for XAS analysis using IFEFFIT. Phys. Scr. 2005, T115, 1011-1014). Quantitative selenium speciation data were obtained by principal

component analysis and linear least-squares fitting of the spectra from reference compounds, including sodium selenite ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Fluka) and sodium selenate (Na_2SeO_4 , Fluka) as inorganic Se compounds, whilst Selenomethionine (SeMet, Across Organics) and Selenocystine (SeCy, Sigma Aldrich) were modeled as organic selenoaminoacids. Nowadays, the least-squares fitting is widely accepted as a valid method for the speciation of complex biological samples (Pickering, I.J.; Brown, G.E., Jr.; Tokunaga, T.K. Quantitative speciation of selenium in soils using X-ray absorption spectroscopy. Environ. Sci. Technol. 1995, 20, 610-613). To examine the sample composition as a linear combination of standard components various fittings of Se reference compounds were calculated repeating the process until no more significant components could be identified and the sum of all components was equal to 100% ($\pm 15\%$). The relative quality of the fit was quantified by the residual value, a measure of how close the fit is to the data based on a sum of squares determination of the fractional misfit defined as follows:

Additionally, fitting procedure accuracy and sensitivity were evaluated by the analysis of synthetic samples and the certified reference material SELM-1 (Selenium Enriched Yeast Certified Reference Material, NRC, Canada).

For the purpose of the following invention, results are expressed in terms of wheat growth parameters, Se distribution and concentration in wheat plants and nutrient uptake effects, have been analysed to determine various effects of Se uptake by plants:

a) Effects of Se on wheat growth parameters:

To check the effect of Se on plant growth several parameters were used: elongation of roots, weight of shoot and roots, and absorption of nutrient solution, which are connected with the needs of normal plant growth.

Results obtained when adding Se at different levels showed that enrichments up to 10 μM Se caused a slightly higher root elongation for selenate treatment (Fig. 1a). By contrast, selenite and mixture treatments at the same range showed no significant differences in root elongation in comparison with the control.

At higher Se concentrations root elongation decreased, reaching the minimum value at 100 μM Se, when visible toxic symptoms could be observed in shoots (strong chlorosis and wilting).

These results showed an external Se effect concentration for a 50% inhibition of root elongation (EC50) of around 100 μM Se for selenite and selenate but not for the mixture of them.

As can be seen in Figure 1b and 1c, the addition of Se in the range of 0-10 μM did not significantly affect root and shoot fresh weight. On the other hand, above 10 μM Se root and shoot fresh weight started to decrease significantly. This is in agreement with root elongation changes mentioned before.

In Figure 1d it can be seen an initial increase of volume of nutrient solution absorption followed by a decrease when Se concentrations applied were greater than 10 μM due to a poorer root absorption capacity at those concentrations.

b) Se concentration and distribution in wheat plants

In Figure 2 are shown Se accumulation and distribution between roots and shoots. For the sake of clarity, these results have been divided into two different figures, related with total Se supplemented in the medium: Figure 2a, from 1 to 10 μM total Se concentration; and Figure 2b, from 50 to 100 μM total Se concentration. It is worthy to note that when selenate stimulates root elongation growth (1 and 10 μM treatments) Se accumulated in wheat plants is about 2.5-fold lower than that for selenite. However, when we worked with toxic selenate concentrations (50 and 100 μM treatments) Se contained in wheat exceeded 1.2-1.65 times those of selenite (Fig. 2).

The percentage of Se distribution kept constant with changes in Se concentration of each enrichment treatment. For selenite and mixture enrichments, Se is mainly accumulated in roots (80% and 70%, respectively), while for selenate the accumulation pattern was different depending on external concentrations. At the lowest selenate concentration (1 μM) Se was equally distributed between roots and shoots: with a 10 μM selenate supply Se levels were two fold higher in shoots than in roots and at the two highest external selenate concentrations, Se was mostly accumulated in shoots at the same percentages (85%). As it can be observed, the different pattern in total Se accumulation could be explained by a different rate of selenate uptake depending on its external concentration. The highest Se concentration found in roots was 335 $\mu\text{g g}^{-1}$ while in shoots was 580 $\mu\text{g g}^{-1}$ which corresponds to the individual highest external selenite and selenate concentrations, respectively.

The shoot/root ratio of total Se content in wheat plants ranged from 0.74 to 5.98 for plants supplied with selenate and was less than 0.25 for plants supplied with selenite, while this ratio ranged from 0.31 to 0.42 when a mixture of Se forms was supplied.

c) Nutrient uptake

The concentration of several important macro and micronutrient elements were analyzed for all treatments in order to evaluate the effect of different Se supplementation on nutrient uptake in the analyzed plants. The macronutrient concentration of Ca, K, Mg, P and S and the micronutrients Cu, Fe, Mn and Zn in roots and shoots of wheat plants for each treatment are shown in figures 3 and 4 respectively, excluding mixture treatments where no significant results were obtained.

d) Effects on macronutrients

It is very important to notice that the increase or decrease in macronutrient concentration was never higher than 35% (Fig. 3), being Ca and S the most affected by Se supplementation. Results also show that, in any case, no redistribution of elements between root and shoot was observed. The loss of concentration in roots, when observed, was never compensated by the concentration in shoots.

As seen in Figure 3a, Ca root uptake was more affected by low Se exposures than under toxic levels (50 and 100 μM Se), especially when applied as selenate. In the case of shoots, minor changes in Ca concentration were observed.

In Figure 3b it can be observed that selenite had greater effect on K uptake than selenate at low exposures (up to 10 μM Se). On the other hand, at high Se levels (up to 50 μM) no significant differences were observed between Se forms. In shoots, K accumulation was not significantly altered by any Se addition.

In Figure 3c it is shown that root Mg uptake suffered different tendencies depending on Se form applied: selenite enrichment caused a decrease in Mg levels, reaching a plateau at 50 μM Se, while selenate decreased Mg uptake up to 10 μM Se but at higher exposures increased it till control Mg levels. Shoot Mg concentrations under Se exposure were similar to control levels except for 50 and 100 μM of selenite, where Mg levels were significantly lower.

Both selenite and selenate caused a similar decrease in root P concentration at high Se supplementation (Fig. 3d). In shoots P level was increased by both Se forms at low exposures while was slightly decreased at high Se exposure, especially by selenate.

In Figure 3e it can be seen that S uptake by roots was not dependent on the Se species added but on Se concentration. At low Se supply (up to 10 μM) S uptake was slightly higher than in control, while for higher Se levels (50 and 100 μM), S content was lower than in control. In shoots all selenite treatments showed a similar behaviour as in roots, while selenate at high concentrations (50 and 100 μM) increased significantly shoot S accumulation.

e) Effects on micronutrients

High selenate concentrations stimulated Cu and Mn root uptake by 12-24% and 30-35% respectively (Figs. 4a and 4c); whereas had no effect on shoot Cu accumulation but caused a 20% reduction on shoot Mn level. High selenite exposures (>10 μM) inhibited Cu and Mn accumulation in both roots and shoots with a great impact (ca. 50%) in shoot Mn level.

As can be seen in Figure 4b, the effect of Se addition on Fe uptake and accumulation was stronger in the form of selenate than of selenite. In roots 10 μM selenate causes a Fe reduction of about 50% that was partially recovered at higher concentrations almost reaching the control level. Shoot effects were less intense than those observed on roots.

The effect of Se in root Zn concentration was mainly noticed at Se levels above 50 μM , causing both species the same stunt, but behaviour in shoots was different: concentration of Zn was mainly unaffected by the presence of Se (Fig. 4d).

For the present invention, as can be seen in Table 2 (table fit results) the proportion of inorganic to amino acid selenium in wheat samples is dependent, not only, on the part of the plant analyzed, but also, on the form of the selenium initially supplied hydroponically. It is noteworthy that the low selenium concentrations in wheat are considered challenging for XAS analysis. That could explain that spectra from 1 μM selenium concentration treatments are noisier than those for the 10 μM enrichments.

	Composition (%)				Sum (%)	Residual
	SeO ₃ ²⁻	SeO ₄ ²⁻	SeCy	SeMet		
1 μM SeO ₃ ²⁻ S	11,3	0,0	60,5	24,5	96,3	0,17
1 μM SeO ₄ ²⁻ R	9,7	0,0	70,7	24,1	104,5	0,17
10 μM SeO ₃ ²⁻ S	16,8	0,0	55,8	35,4	108,0	0,16
10 μM SeO ₄ ²⁻ R	6,9	0,0	50,8	42,3	100,0	0,07
1 μM SeO ₄ ²⁻ S	0,0	32,5	5,7	61,9	100,1	0,49
1 μM SeO ₃ ²⁻ R	0,0	27,9	15,9	56,2	100,0	0,54
10 μM SeO ₃ ²⁻ S	0,5	50,9	0,0	48,6	100,0	0,21
10 μM SeO ₄ ²⁻ R	4,9	38,2	27,9	32,3	103,3	0,07
1 μM mixture S	24,9	8,1	81,5	0,0	114,5	0,63
1 μM mixture R	7,5	2,4	98,3	0,0	108,2	0,75
10 μM mixture S	17,5	12,3	75,4	0,0	105,2	0,32
10 μM mixture R	9,0	2,0	73,6	15,3	99,9	0,08

Table 2

Table shows linear combination fit results of the samples (R=root, S=shoot). Raw quantitative compositional results in percentage, sums of components for each sample and residual values corresponding to the quality of the fit.

Concerning selenite enrichment treatments, although it is observed the same selenium speciation distribution proportion in shoots and roots samples, the overall total selenium concentration is higher in the plant root as reported previously, this is in accordance with Mounicou et.al. results in the selenite enriched *Brassica Juncea*, a selenium enriched accumulator plant (Mounicou, S.; Vonderheide, A.P.; Shann, J.R.; Caruso, J.A. Comparing a selenium accumulator plant (*Brassica juncea*) to a nonaccumulator plant (*Helianthus annuus*) to investigate selenium-containing proteins. Anal. Bioanal. Chem. 2006, 386, 1367-1378). As expected in the selenite fortification, no selenate is present in any part of the plant, so it basically reduces selenite to organoselenium compounds as SeMet and SeCy, being the latest the major selenocompound in this case.

For selenate enrichment treatments a small percentage of selenium remains as selenite (1-5%), i.e. a significant percentage of selenate is not metabolized (27-50%) but the metabolized amount is easily reduced to the corresponding organic selenium compounds as SeCy and SeMet.

As for the selenite enrichments SeCy is the major selenoaminoacid, in the case of selenate enrichments it is the minor, being SeMet the predominant form.

In the case of mixed selenite and selenate treatments results show that the amount of inorganic selenium is higher in shoots compared with roots. On the other hand, looking at the organoselenium content, selenium is mainly accumulated in both roots and shoots as SeCy except in 10 μ M enriched roots where a small percentage of SeMet is present.

Concerning Se biofortification, it is noteworthy that we are looking for Se enrichment procedures that mainly accumulate organic selenium forms in shoots, so shoots are the first stage of wheat growth and they will determine the Se wheat content that is going to be used for the manufacture of Se enriched products. Comparing all selenium enrichment treatments, enriching with selenate we obtain the lower selenium organic content in shoots, on the other hand, the selenite one accumulates a higher organic selenium content in shoots as previously reported have shown toxicity symptoms when wheat is exposed to that treatment. In mixture treatments the selenium total organic content in shoots is higher than in selenate though slightly lower than in selenite, however, it was proved above that mixtures attenuate selenite toxicity. To conclude, results have shown that the best way to anthropogenically enrich selenium in order to obtain a higher organic selenium content in shoots and no toxicity symptoms is mixing both selenite and selenate species at equal concentrations (5 μ M Se as selenite and 5 μ M Se as selenate).

On the other hand, obtained results reveal that the variation of Selenite/Selenate ratio produces a significative effect on the nature of aminoacids obtained. Thus in Table 2, it is possible to observe how the production of Selenomethionine increases in favor of Selenocysteine when the Selenite/Selenate ratio decreases. This effect correlates the redox conditions of the hydroponic solution provided by the Selenite/Selenate ratio with the observed redox behavior of the corresponding selenoaminoacids Selenocysteine and Selenomethionine observed at the related XANES Spectra. This finding provides us a way to tune chemically the conditions for a specific selenoaminoacid production.

Therefore, for the present invention, these observed effects in Figure 1 can also be seen on the fresh weight of both roots and shoots and on the amount adsorbed from plant solution. In addition, these results confirm a duality of Se effects concerning both the level of concentration

applied to the nutrient solution and the chemical form of Se used to feed plants. Such duality of Se concentration has been previously reported in other works (Hopper and Parker, 1999; Hartikainen et al. 2000; Cartes et al. 2005; Feng et al. 2009) but they have only tested individual Se forms (selenite or selenate) not their mixtures. The toxicity observed can be interpreted as the irruption of Selenium species on both the amino acids generation process (ref) and possibly on the cellular energy production path.

Surprisingly, the presence of both Se species mixed together in nutrient solution at highest concentrations tested (25+25 and 50+50) show lower toxicity than selenite alone at 50 or 100 μ M, suggesting that selenate attenuates toxicity of selenite in mixtures.

On the other hand, most plants contain less than 25 μ g Se g⁻¹ dry matter and are termed non-accumulators (White et al. 2004). Such plants absorb Se but are incapable of tolerating high Se in their tissues and environment, thus Se toxicity occurs below about 10-100 μ g Se g⁻¹ dry matter, although the exact value depends critically upon the selenate:sulfate molar ratio in the rhizosphere solution. These plants tolerate low Se concentrations in the rhizosphere by restricting Se uptake and movement to shoots (Wu and Lag, 1988; Wu and Huang, 1992). Spring wheat is considered a non-Se-accumulator but it has relatively high tolerance when compared with other non-accumulator plants because Se toxicity occurs above 100 μ g Se g⁻¹ dry matter. The ability of wheat plants to accumulate and translocate Se from roots to shoots is highly dependent on the chemical form of Se and on the amount of Se applied to the nutrient solution as it is already reported in other works (Li et al. 2007; Govasmark et al. 2008; Feng et al. 2009).

Concerning total Se concentration in whole plant, two different behaviours could be observed: at low external Se levels (1 and 10 μ M) the highest total Se concentration was observed in selenite cultures, while at high external Se levels (50 and 100 μ M) it was selenate exposed plants which exhibited a higher concentration. Surprisingly, at low external Se concentrations Se level in plants treated with mixtures was always a bit lower than total Se of plants treated with selenite but higher than the level found in plants treated with selenate. Even more, at high external Se supply Se level in plants exposed to mixtures was always lower than those of plants treated with individual Se forms. These results could be due to a possible interaction between selenite and selenate. It seems that selenite uptake is favoured in front of selenate because most Se accumulated from mixture treatments is found in roots, organ where selenite preferentially accumulates when individually applied. The intensity of the interaction

remains constant with increasing external Se mixture concentration as can be seen by the constant Se distribution in all Se mixture treatments (25-30% shoots / 70-75% roots). Thus, low Se tissue level found in plants treated with high Se mixture concentrations is probably due to a greater translocation of Se at high external selenate levels but not to a major interaction between different Se species.

These differences in Se uptake and movement in different parts of plant due to the variation in the species of Se applied to the media suggests that the bioassimilation of each Se species follows its own metabolic pathway.

Also, the observed efficiency of wheat plants to transport selenate to shoots (80%) can be due to two complementary mechanisms: a way of protecting the plant against selenate toxicity by accumulating it in leave vacuoles and, at the same time, a way that facilitates part of its further elimination by formation of Se volatile species. Se compartmentalized in leave vacuoles is less toxic because it has poor mobilization and incorporation into proteins. In our experiments selenite tends to accumulate in roots more than in shoots which is in accordance with the literature (Hopper and Parker, 1999; Feng et al. 2009) and only about 20% of selenite taken up has been transported to shoots which is comparable to the small fraction found by Arvy (1993) and the 10% reported by De Souza et al. (2000) in dicotyledonous species. This unequal distribution can be explained by the non-enzymatic transformation of selenite to toxic organoselenium species, which are not transported from roots to shoots (De Souza et al. 2000). Organic Se forms can readily enter sulphur assimilation pathways, leading to more Se substitution into proteins (Smith and Watkinson, 1984; De Souza et al. 1998). At shoot Se comparable levels (10 μ M), Se from selenate treated plants stimulated root growth while selenite did not. Similar results were observed in ^{75}Se -selenate and ^{75}Se -selenite treated excised roots of *Astragalus lentiginosus*, a non-accumulator (Shrift and Ulrich, 1969). When plants were treated with selenate, 98% of accumulated Se remained as selenate, whereas under selenite treatment, plants retained about 51% selenite, 23% selenate and only 19% in neutral or basic form, postulated to be SeMet. These data suggest that some plants are able to oxidize selenite back to selenate in small amounts.

In the case of mixture experiments, distribution between roots and shoots resembles more to the one of selenite than selenate. This may suggest that the presence of selenite in the medium blocks the transportation of selenate to shoots. This observation, together with the fact

that selenite accumulates mainly in roots, can be the explanation for the parallelism observed for plants supplemented with only selenite and mixtures in terms of growth parameters related with roots (root elongation and fresh weigh, and absorbed nutrient solution). In general, the transport of Se from roots to biomass is closely connected with the chemical form of applied Se as reported in (Zayed et al. 1998). Further studies will be necessary to elucidate, not only the distribution of Se species applied for the enrichment, but also Se speciation in each part of the plant to better understand the Se bio-assimilation process.

In connection with the effects of Se on nutrient uptake; in general trends the inventors can observe that the uptake of macronutrients was less affected by the presence of Se than that of micronutrients, as already expected if we take into account the important role of these macronutrients in plant surviving. Se effect on roots was different from its effect on shoots; and those elements which mainly accumulate in roots (i.e. Ca, Fe, Zn and Mn) were more sensible to Se presence.

Ca presence is essential in the cell wall and together with K are in charge of membrane integrity thus the increased Ca and Mg level with increasing high Se concentration (Figs. 3a and 3c) could be a way to re-establish the integrity of root membranes under severe Se toxicity.

The fact that shoot P level is more affected by selenate than by selenite which is the form that has chemical similarity with phosphate suggests that selenite is not interfering with P uptake at low concentrations but at high Se:P ratios an increase in competition together with other metabolic interactions are responsible of the decreased tissue P level.

Our results are in accordance with that from Wu and Huang (1992) with tall fescue, a grass like wheat, where Ca concentration was increased but P concentration was decreased under Se stress and with those from Hopper and Parker (1999) who found an inhibition of P uptake by Se in *Lolium perenne* and *Trifolium fragiferrum*.

The extraordinary S uptake and translocation to shoots at high selenate treatments (Fig. 3e) is in agreement with the findings of Bell et al. (1992). A comparative study conducted by these authors on the antagonism between selenate and sulfate concluded that Se accumulators preferentially absorb Se in the face of competition with sulfate but non-accumulators discriminate against selenate uptake relative to sulfate. They observed that the non-accumulator plant had

increased shoot S concentration by increasing selenate in solution, but only when shoot Se was above 20 $\mu\text{g g}^{-1}$ DW. In our study wheat plants (non-accumulator) that presented these high shoot S level have above 250 $\mu\text{g Se g}^{-1}$ DW while plants with no change in shoot S levels have less than 30 $\mu\text{g Se g}^{-1}$. Selenate-induced stimulation of S uptake may be a result of incipient Se toxicity, which is in accordance with root-elongation and growth-inhibition by this Se species.

It is proved that expression regulation of high-affinity sulfate transporter genes (HAST) is mediated by S plant status, where elevated concentrations of sulfate and glutathione (GSH) down-regulate transcription and O-acetyl-L-serine (OAS) increases transcription (Hirai et al. 2003; Maruyama-Nakashita et al. 2003). In our nutrient solution sulfate level could be suboptimum for wheat and with increasing selenate exposure competition between both ions increases causing induction in the expression of HAST transporters. White et al. (2004) suggested that inducible high affinity sulfate transporters are more selective for sulfate than constitutively expressed low affinity transporters in the non-accumulator *A. thaliana*. Their work also provides further evidence that competition between Se and S for assimilation and incorporation into proteins contributes to Se toxicity symptoms in plants.

Phytotoxicity of high Se levels is associated mainly with non-specific replacement of sulphur amino acids by their Se analogues (Terry et al. 2000). Moreover, this effect may result from disturbances in mineral balance, which is indicated by the analysis of nutrient composition of wheat plants performed in the present experiment. Toler et al. (2007) found in *Brassica oleracea* a positive correlation between selenate concentration in solution and Se and S uptake.

Although Cu and Mn are essential trace elements for plant development and growth, they are toxic when in excess (Pittman 2005). Many heavy metals stimulate the formation of free radicals and render oxidative stress, either by direct electron transfer or inhibition of normal metabolic reactions (Hall 2002; Metwally et al. 2005).

Concerning micronutrients, their uptake was affected by Se presence in different ways. Fe uptake showed a differential behaviour probably due to its high concentration in plants compared with other micronutrients. In both roots and shoots, all selenate treatments caused a reduction of Fe uptake. Chlorosis observed in plants exposed at toxic Se levels can be a consequence of the strong Se-interaction with Fe, Mn and Cu uptake. Molnárová and Fargasová

(2009) found a strong photosynthetic pigment reduction in *Triticum aestivum* under Se exposure that can be related with low Fe levels in shoots.

Cartes et al. (2005) and previously Hartikainen et al. (2000) reported the duality of Se effects on the antioxidative system in ryegrass; at low concentrations Se acted as an antioxidant whereas at shoot Se concentrations above 20 mg kg^{-1} DW it acted as a pro-oxidant by increasing lipid peroxidation and reducing yields. In our study, wheat presented toxicity symptoms and significant reduced root elongation growth at shoot Se concentrations above 30 mg kg^{-1} DW while below this concentration it had a stimulant effect on root growth and biomass production which is in accordance with the previously discussed.

Results obtained allow to conclude that both Se species tested, selenite and selenate, behave differently when absorbed by wheat plants in hydroponics culture, and the effects in plants are strongly dependent on Se species concentration in solution. However, the uptake of macronutrients was not strongly affected by the presence of any Se form, while the effect in micronutrient uptake was directly related with the element studied, without observing a common behavior for all checked elements.

It is remarkably that the largest differences in nutrient content we determined, as compared to control plants, were closely connected with high tissue Se levels and a considerable decrease in dry matter of plants and a reduction of root growth. Thus, regarding to Se supplementation of wheat plants, the form of Se applied should be taken into account as well as the total Se concentration.

In connection with, aspects of Selenium uptake mechanism; the observed differences on the distribution of Se in wheat plants after the uptake of corresponding inorganic forms of Selenium, indicate that possible interconversion of selenate to selenite or viceversa is very improbable in both the hydroponic solution or in the wheat plant tissues. So, it looks like a different path for the absorption of each selenium species is taking place. Thus, transport of selenate is more active than selenite, since Se is mostly accumulated on the plant shoots when using selenate in the hydroponic solution, while using selenite, Se is accumulated in the plant roots, what, according to Xiao-Zhang Yu, Ji-Dong Gu (2008), reveals a possible dependency on plant transpiration.

In addition, Hua-Fen Li, Steve P. McGrath and Fang-Jie Zhao (2008) reported that the uptake of selenite depends on the related metabolism process. Thus, they indicate that spite of the similarity between the uptake rates of selenite and selenate by wheat, selenite is faster assimilated into organic forms in roots than selenate, having a lower mobility in xylem transport than selenate that is not readily assimilated into organic forms and will circulate fast in xylem transport. These properties can explain our results on the different distribution of Se in wheat plants when feeding them with each one of the two different Se species. Results corresponding to the mixture of the two species also support the interpretation of the individual behaviour, so Se is mostly accumulated in roots because of the explained fast selenite uptake and also shoots are less loaded since selenite seems to hinder the transport of selenate in the xylem, as reported by the indicated authors.

REFERENCES:

- Arvy MP (1993) Selenate and selenite uptake and translocation in bean plants (*Phaseolus vulgaris*). *J Exp Bot* 44:1083-1087.
- Arvy MP, Thiersault M, Doireau P (1995) Relationship between selenium, micronutrients, carbohydrates, and alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* cells. *J Plant Nutr* 18:1535-1546.
- Asher CJ, Edwards DG (1983) Modern solution culture techniques. In: Lauchli A and Bielecki RL (eds) *Encyclopedia of Plant Physiol. New Series* 15A:94-119.
- Bell PF, Parker DR, Page AL (1992) Contrasting selenate sulfate interactions in selenium-accumulating and non accumulating plant-species. *Soil Sci Soc Am J* 56(6):1818-1824.
- B'Hymer C, Caruso JA (2006) Selenium speciation analysis using inductively coupled plasma-mass spectrometry. *J Chromatogr, A* 1114:1-20.
- Broyer TC, Johnson CM, Huston RP (1972) Selenium and Nutrition of *Astragalus*. II. Ionic sorption interactions among selenium, phosphate, and macronutrient and micronutrient cations. *Plant Soil* 36:635-649.
- Cartes P, Gianfreda L, Mora ML (2005) Uptake of selenium and its antioxidant activity in ryegrass when applied as selenate and selenite forms. *Plant Soil* 276:359-367.
- Clark LC, Combs GF, Turnbull BW, Slate EH, Chalker DK, Chow J, Davis LS, Glover RA, Graham GF, Gross EG, Krongrad A, Leshner JL, Park HK, Sanders BB, Smith CL, Taylor JR (1996) Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. *J Am Med Assoc* 276:1957-1963.
- Deagen JT, Butler JA, Zachara BA, Whanger PD (1993) Determination of the distribution of selenium between glutathione peroxidase, selenoprotein P, and albumin in plasma. *Anal Biochem* 208:176-181.
- Deagen JT, Beilstein MA, Whanger PD (1991) Chemical forms of selenium in selenium containing proteins from human plasma. *J Inorg Biochem* 41:261-268.
- De Souza MP, Pilon-Smits EAH, Lytle CM, Hwang S, Tai J, Honma TSU, Yeh L, Terry N (1998) Rate-limiting steps in selenium assimilation and volatilization by Indian mustard. *Plant Physiol* 117:1487-1494.
- De Souza MP, Pilon-Smits EAH, Terry N (2000) The physiology and biochemistry of selenium volatilization by plants. In: *Phytoremediation of toxic metals: Using plants to clean up the environment*. Raskin I and Ensley BD (eds). Wiley-Interscience Publication, New York, pp 171-190.
- Ellis DR, Salt DE (2003) Plants, selenium and human health. *Curr Opin Plant Biol* 6, 273-279.
- Fargašová A, Pastierová J, Svetková K (2006) Effect of Se-metal pair combinations (Cd, Zn, Cu, Pb) on photosynthetic pigments production and metal accumulation in *Sinapis alba* L. seedlings. *Plant, Soil Environ* 52: 8-15.
- Feng RW, Wei CY, Tu SX, Wu FC (2009) Effects of Se on the uptake of essential elements in *Pteris vittata* L. *Plant Soil* 325:123-132.
- Finley JW (2005) Selenium accumulation in plant foods. *Nutr Rev* 63, 196-202.
- Govasmark E, Singh BR, MacLeod JA, Grimmett MG (2008) Selenium concentration in spring wheat and leaching water as influenced by application times of selenium and nitrogen. *J Plant Nutr* 31: 193-203.
- Hall, JL (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot* 53, 1-11.
- Hartikainen H, Xue TL, Piironen, V (2000) Selenium as an anti-oxidant and pro-oxidant in ryegrass. *Plant Soil* 225:193-200.
- Hirai MY, Fujiwara T, Awazuhara M, Kimura T, Noji M, Saito K (2003) Global expression profiling of sulfur-starved *Arabidopsis* by DNA macroarray reveals the role of O-acetyl-L-serine as a general regulator of gene expression in response to sulfur nutrition. *Plant J* 33:651-663.
- Hopper JL, Parker DR (1999) Plant availability of selenite and selenate as influenced by the competing ions phosphate and sulphate. *Plant Soil* 210:199-207.
- Huerta VD, Reyes LH, Marchante-Gayon JM, Sanchez MLF, Sanz-Medel A (2003) Total determination and quantitative speciation analysis of selenium in yeast and wheat flour by isotope dilution analysis. *J Anal At Spectrom* 18:1243-1247.

- Li HF, McGrath SP, Zhao FJ (2007) Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite. *New Phytol* 178(1):92-102.
- Lyons G, Stangoulis J, Graham R (2003) High-selenium wheat: biofortification for better health. *Nutr Res Rev* 16:45-60.
- Maruyama-Nakashita A, Inoue E, Watanabe-Takahashi A, Yamaya T, Takahashi H (2003) Transcriptome profiling of sulfur-responsive genes in *Arabidopsis* reveals global effects of sulfur nutrition on multiple metabolic pathways. *Plant Physiol* 132:597-605.
- Mester Z, Willie S, Yang L, Sturgeon R, Caruso JA, Fernandez ML, Fodor P, Goldschmidt RJ, Goenaga-Infante H, Lobinski R, Maxwell P, McSheehy S, Polatajko A, Sadi BBM, Sanz-Medel A, Scriver C, Szpunar J, Wahlen R, Wolf W (2006) Certification of a new selenized yeast reference material (SELM-1) for methionine, selenomethionine and total selenium content and its use in an intercomparison exercise for quantifying these analytes. *Anal Bioanal Chem* 385:168-180.
- Metwally A, Safronova VI, Belimov AA, Dietz KJ (2005) Genotypic variation of the response to cadmium toxicity in *Pisum sativum*. *J Exp Bot* 56:167-178.
- Molnárová M, Fargasová A (2009) Se (IV) phytotoxicity for monocotyledonae cereals (*Hordeum vulgare* L., *Triticum aestivum* L.) and dicotyledonae crops (*Sinapis alba* L., *Brassica napus* L.). *J Hazard Mater* 172:854-861.
- Montes-Bayón M, Molet MJD, Gonzalez EB, Sanz-Medel A (2006) Evaluation of different sample extraction strategies for selenium determination in selenium-enriched plants (*Allium sativum* and *Brassica juncea*) and Se speciation by HPLC-ICP-MS. *Talanta* 68(4):1287-1293.
- Navarro-Alarcon M, Cabrera-Vique C (2008) Selenium in food and the human body: A review. *Sci Total Environ* 400:115-141.
- Pittman JK (2005) Managing the manganese: molecular mechanisms of manganese transport and homeostasis. *New Phytol* 167:733-742.
- Pyrzynska K (2002) Determination of selenium species in environmental samples. *Microchim Acta* 140:55-62.
- Polatajko A, Jakubowski N, Szpunar J (2006) State of the art report of selenium speciation in biological samples. *J Anal At Spectrom* 21(7):639-654.
- Rayman M.P. (2004) The use of high-selenium yeast to raise selenium status: how does it measure up? *Br J Nutr* 92:557-573.
- Schrauzer GN (2001) Nutritional Selenium Supplements: Product Types, Quality, and Safety. *J Am Coll Nutr* 20(1):1-4.

- Stranges S, Marshall JR, Trevisan, M, Natarajan R, Donahue RP, Combs GF, Eduardo Farinara E, Clark LC, and Reid ME (2006) Effects of Selenium Supplementation on Cardiovascular Disease Incidence and Mortality: Secondary Analyses in a Randomized Clinical Trial. *Am J Epidemiol*;163:694-699
- Shrift A, Ulrich J (1969) Transport of selenate and selenite into *Astragalus* roots. *Plant Physiol* 44:893-896.
- Smith GS, Watkinson JH (1984) Selenium toxicity in perennial ryegrass and white clover. *New Phytol.* 97, 557-564.
- Tanner SD, Baranov VI, Bandura DR (2002) Reaction cells and collision cells for ICP-MS: a tutorial review. *Spectrochimica Acta Part B: At Spectrosc* 57:1361-1452.
- Terry N, Zayed AM, de Souza MP, Tarun AS (2000) Selenium in Higher Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51:401-432.
- Toler HD, Charron CS, Sams CE, Randle WR (2007) Selenium increases sulfur uptake and regulates glucosinolate metabolism in rapid-cycling *Brassica oleracea*. *J Am Soc Hortic Sci* 132:14-19.
- Ulrich JM, Shrift A (1968) Selenium absorption by excised *Astragalus* roots. *Plant Physiol* 43:14-20.
- White PJ, Bowen HC, Parmaguru P, Fritz M, Spracklen WP, Spiby 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*. *J Exp Bot* 55:1927-1937.
- Wilburn RT, Vonderheide AP, Soman RS, Caruso JA (2004) Speciation of selenium in the mushroom *Boletus edulis* by high-performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma-mass spectrometry with a collision cell. *Appl Spectrosc* 58:1251-1255.
- Wu XF, Lag J (1988) Selenium in Norwegian farmland soils. *Acta Agric Scand* 38(3):271-276.
- Wu L, Huang ZZ (1992) Selenium assimilation and nutrient element uptake in white clover and tall fescue under the influence of sulfate concentration and selenium tolerance of the plants. *J Exp Bot* 43:549-555.
- Xiao-Zhang Yu, Ji-Dong Gu (2008), Differences in uptake and translocation of selenate and selenite by the weeping willow and hybrid willow, *Environ Sci Pollut Res* 15:499-508
- Zayed A., Lytle C.M. and Terry N. (1998) Accumulation and volatilization of different chemical species of selenium by plants. *Planta* 206:284-292.

- Zhu YG, Pilon-Smits EAH, Zhao FJ, Williams PN, Meharg AA (2009) Selenium in higher plants: understanding mechanisms for biofortification and phytoremediation. *Trends Plant Sci* 14:436-442.
- Polatajko, A.; Jakubowski, N.; Szpunar, J. State of the art report of selenium speciation in biological samples. *J. Anal. At. Spectrom.* 2006, 21 (7), 639-654.
- Clark, L.C.; Combs, G.F.; Turnbull, B.W.; Slate, E.H.; Chalker, D.K.; Chow, J.; Davis, L.S.; Glover, R.A.; Graham, G.F.; Gross, E.G.; Krongrad, A.; Leshner, J.L.; Park, H.K.; Sanders, B.B.; Smith, C.L.; Taylor, J.R. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. *J. Am. Med. Assoc.* 1996, 276, 1957-1963.
- Muñoz Olivas, R; Donard, O.F.X.; Camara, C.; Quevauviller, P. Analytical techniques applied to the speciation of selenium in environmental matrices. *Anal. Chim. Acta.* 1994, 286, 357-370.
- Lyons, G.; Stangoulis, J.; Graham, R. High-selenium wheat: biofortification for better health. *Nutr. Res. Rev.* 2003, 16, 45-60.
- Hawkesford, M.J.; Zhao, F.J. Strategies for increasing the selenium content of wheat. *J. Cereal Sci.* 2007, 46 (3), 282-292.
- Navarro-Alarcon, M.; Cabrera-Vique, C. Selenium in food and the human body: A review. *Sci. Total Environ.* 2008, 400, 115-141.
- Terry, N.; Zayed, A.M.; de Souza, M.P.; Tarun, A.S. Selenium in Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 2000, 51, 401-432.
- Prange, A.; Modrow, H. X-Ray absorption spectroscopy and its application in biological, agricultural and environmental research. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technol.* 2002, 1, 259-276.
- Lombi, E.; Susini, J. Synchrotron-based techniques for plant and soil science: opportunities, challenges and future perspectives. *Plant Soil.* 2009, 320, 1-35.
- Feldmann, J. What can the different current detection methods offer for element speciation? *Trends Anal. Chem.* 2005, 24 (3), 228-242.
- Pickering, I.J.; Wright, C.; Bubner, B.; Ellis, D.; Persans, M.W.; Yu, E.Y.; George, G.N.; Prince, R.C.; Salt, D.E. Chemical form and distribution of selenium and sulfur in the selenium hyperaccumulator *Astragalus bisulcatus*. *Plant Physiol.* 2003, 131, 1460-1467.
- Pickering, I.J.; Prince, R.C.; Salt, D.E.; George, G.N. Quantitative, chemically specific imaging of selenium transformation in plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000, 97 (20), 10717-10722.

- Cruz-Jimenez, G.; Peralta-Videa, J.R.; de la Rosa, G.; Meitzner, G.; Parsons, J.G.; Gardea-Torresdey, J.L.
- Effect of sulfate on selenium uptake and chemical speciation in *Convolvulus arvensis*. *L. Environ. Chem.* 2005, 2, 100-107.
- Freeman, J.L.; Zhang, L.H.; Marcus, M.A.; Fakra, S.; McGrath, S.P.; Pilon-Smits, E.A.H. Spatial imaging, speciation, and quantification of selenium in the hyperaccumulator plants *Astragalus bisulcatus* and *Stanleya pinnata*. *Plant Physiol.* 2006, 142, 124-134.
- Zayed, A.; Lytle, M.; Terry, N. Accumulation and volatilization of different chemical species of selenium by plants. *Planta.* 1998, 206 (2), 284-292.
- Bulska, E.; Wysocka, I.A.; Wierzbicka, M.H.; Proost, K.; Janssens, K.; Falkenberg, G. In vivo investigation of the distribution and the local speciation of selenium in *Allium cepa* L. by means of microscopic X-ray absorption near-edge structure spectroscopy and confocal microscopic X-ray fluorescence analysis. *Anal. Chem.* 2006, 78 (22), 7616-7624.
- Koningsberger, D.C.; Prins, R. X-ray absorption. Wiley, New York, 1988.
- Webb, S. M. A graphical user interface for XAS analysis using IFEFFIT. *Phys. Scr.* 2005, T115, 1011-1014.
- Pickering, I.J.; Brown, G.E., Jr.; Tokunaga, T.K. Quantitative speciation of selenium in soils using X-ray absorption spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 1995, 20, 610-613.
- Thavarajah, D; Vandenberg A.; Graham, N.G.; Pickering I.J. Chemical form of selenium in naturally selenium-rich lentils (*Lens culinaris* L.) from Saskatchewan. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 7337-7341.
- Mounicou, S.; Vonderheide, A.P.; Shann, J.R.; Caruso, J.A. Comparing a selenium accumulator plant (*Brassica juncea*) to a nonaccumulator plant (*Helianthus annuus*) to investigate selenium-containing proteins. *Anal. Bioanal. Chem.* 2006, 386, 1367-1378.

CLAIMS

1. Method to enrich plants, roots or fruits in selenoaminoacids, wherein the plants, roots or fruits are fed with a nutrient solution comprising a selenium salt at a total selenium concentration less than 100µM, having a redox potential between -0.2 and +0.95 volts.
2. Method to enrich plants, roots or fruits in selenoaminoacids, according to claim 1, wherein the plants, roots or fruits are fed with a nutrient solution comprising at least one of sodium selenite ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) and sodium selenate (Na_2SeO_4) at a total selenium concentration less than 100µM, having a redox potential between -0.2 and +0.95 volts.
3. Method to enrich plants, roots or fruits in selenoaminoacids, according to claim 1, wherein the plants, roots or fruits are fed with a nutrient solution comprising at least two selenium salts at a total selenium concentration less than 100µM, having a redox potential between -0.2 and +0.95 volts.
4. Method to enrich plants, roots or fruits in selenoaminoacids, according to claim 3, wherein the plants, roots or fruits are fed with a nutrient solution comprising sodium selenite ($\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) and sodium selenate (Na_2SeO_4) at a total selenium concentration less than 100µM, having a redox potential between -0.2 and +0.95 volts.
5. Method to enrich plants, roots or fruits according to any previous claim, wherein the plants, roots or fruits are fed with a nutrient solution comprising less than 100µM selenium as sodium selenite or sodium selenate in order to have the plants, roots or fruits enriched with a higher proportion of selenocysteine than selenomethionine.
6. Method to enrich plants, roots or fruits according to any previous claim, wherein the plants, roots or fruits are fed with a nutrient solution comprising equal molarities of sodium selenite and sodium selenate.
7. Method to enrich cereal plants according to any of the previous claims.
8. Method to enrich wheat according to claim 7.

9. Plant, root or fruit enriched in organic selenium using the method of any one of claims 1 to 6.
10. Plant, root or fruit according to claim 9 that is a cereal plant.
11. Plant, root or fruit according to claim 10 that is wheat, maize, rice, barley, oat or sorghum.
12. Cereal product obtained from the cereal plant of claims 10 or 11.
13. Cereal product according to claim 11 that is cereal grains, cereal flour or cereal stems.
14. Method to enrich plants, roots or fruits according to claims 1 to 6 with organic Selenium.

ABSTRACT

The present invention relates to a method to enrich plants in organic selenium, wherein the plant is fed with a nutrient solution enriched with at least one of sodium selenite and sodium selenate at a total selenium concentration less than $10\mu\text{M}$, a plant enriched in organic selenium using this method and a product obtained from this plant.

FIGURES

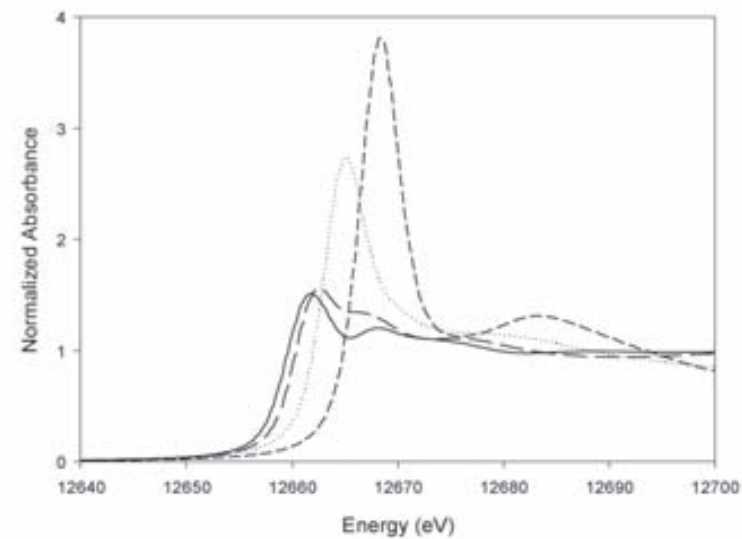


FIG. 1

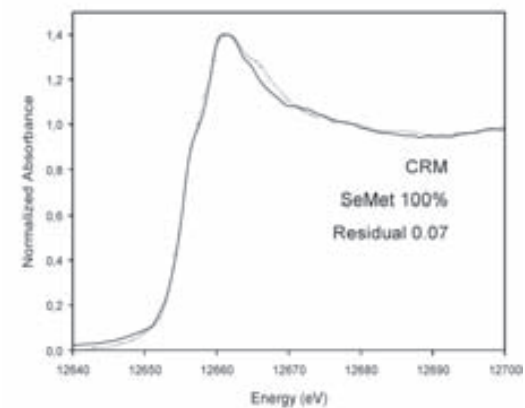


FIG. 2

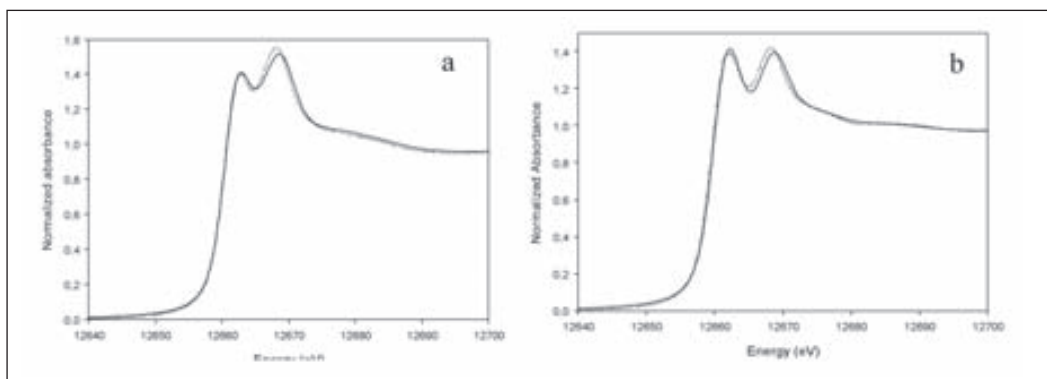


FIG. 3