

Selenio y su efecto en el estado antioxidante y la composición mineral de la lechuga*

Selenium and its effect on antioxidant status and mineral composition of lettuce

María de Lourdes López-Gutiérrez¹, Adalberto Benavides-Mendoza¹, Hortensia Ortega-Ortíz², Luis Alonso Valdez-Aguilar¹, Marcelino Cabrera-De la Fuente¹ y Alberto Sandoval-Rangel^{1§}

¹Departamento de Horticultura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, Saltillo, Coahuila. C. P. 25315 México. ²Departamento de Materiales Avanzados, Centro de Investigación en Química Aplicada, Blvd. Enrique Reyna 140, Saltillo, Coahuila. C. P. 25294. [§]Autor para correspondencia: alberto.sandoval@uaaan.mx.

Resumen

El selenio es un elemento que no aparece en los listados de elementos esenciales para las plantas y no se considera en los análisis de suelos, aguas y tejidos vegetales. Diferentes reportes indican que el Se parece asociarse con cambios en el estado redox celular. El objetivo de este estudio fue realizar aplicaciones de selenio en plantas de lechuga (*Lactuca sativa*) para verificar el efecto sobre el crecimiento, composición y metabolismo antioxidante. El experimento consistió en la aplicación de selenio de sodio en forma foliar en concentraciones de 0, 5 y 10 mg L⁻¹ a los 15, 30 y 45 días después del trasplante. En las plantas se determinó el potencial de óxido-reducción, la biomasa, la concentración de minerales y la actividad catalasa foliar. La aplicación de selenio fue efectiva para modificar el potencial de óxido-reducción y elevar la actividad catalasa sin causar modificaciones en el contenido de minerales y la biomasa.

Palabras clave: catalasa, lechuga, minerales, selenito de sodio.

Abstract

Selenium is an element that does not appear on the lists of essential elements for plants and it is not considered in soil analysis, water and plant tissues. Different reports indicate that it seems to be associated with changes in cellular redox state. The aim of this study was to apply selenium in lettuce (*Lactuca sativa*) to assess the effect on growth, composition and antioxidant metabolism. The experiment consisted on the application of sodium selenite as foliar in concentrations of 0, 5 and 10 mg L⁻¹ at 15, 30 and 45 days after transplantation. In plants the redox potential, biomass, mineral concentration and leaf catalase activity was determined. The application of selenium was effective in changing the redox potential and increase catalase activity without causing changes in mineral content and biomass.

Keywords: catalase, lettuce, minerals, sodium selenite.

Introducción

El selenio es un elemento esencial para los humanos pero calificado como no esencial para las plantas. Sin embargo, en presencia de selenio en el sustrato o aplicado por aspersión foliar las plantas lo acumulan en sus tejidos, sirviendo como fuente primaria de este elemento en la alimentación (Broadley *et al.*, 2006). En la mayoría de los suelos del mundo la concentración de selenio es baja, de 0.01 a 2 mg kg⁻¹ con una media de 0.4 mg kg⁻¹, aunque pueden encontrarse en suelos denominados seleníferos concentraciones de hasta 1 200 mg kg⁻¹ de Se (Fordyce, 2005). Se considera que el selenio es esencial en los humanos por su papel como cofactor de enzimas relacionadas con el metabolismo antioxidante (Rayman, 2008). En las plantas el selenio también ejerce un efecto positivo en la capacidad antioxidante, actuando más efectivamente este elemento en forma de selenito que en forma de selenato (Cartes *et al.*, 2005). En México los estudios acerca de la relación entre el selenio y la calidad nutricional de los alimentos en términos de su capacidad antioxidante son pocos y por ello el objetivo de este trabajo fue documentar el efecto de las aplicaciones de selenio en plantas de lechuga, verificando el crecimiento de las plantas, la composición mineral de las hojas y la capacidad antioxidante de los extractos celulares foliares. Lo anterior bajo la hipótesis de que la aplicación de este elemento modificará el balance redox celular, aumentando la capacidad antioxidante de los tejidos de la planta.

Materiales y métodos

El presente trabajo se llevó a cabo en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), en Saltillo, Coahuila, México, en condiciones de invernadero, teniendo una temperatura y humedad relativa promedio de 17.8 °C y 68% respectivamente. Se utilizaron semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) de la variedad Great Lakes, estas se colocaron en charolas germinadoras de 200 cavidades utilizando como sustrato peat moss y perlita para germinación. Transcurridos 40 días después de la siembra las plántulas se trasplantaron a macetas de polietileno de 20 L usando como sustrato una mezcla de peat moss y perlita con una proporción de 70:30 v: v. Los tratamientos consistieron en aplicaciones foliares de selenio en concentración de 0, 5 y 10 mg L⁻¹ a los 15, 30 y 45 días después del trasplante. Como fuente de selenio se utilizó selenito de sodio (Na₂SeO₃, Sigma Aldrich, USA) sin mezclarlo con coadyuvantes.

Introduction

Selenium is an essential element for humans but qualified as non-essential for plants. However, the presence of selenium in the substrate or applied by foliar spraying, plants accumulate it in their tissues, working as primary source of this element in the diet (Broadley *et al.*, 2006). In most soils worldwide selenium concentration is low, from 0.01 to 2 mg kg⁻¹ with an average of 0.4 mg kg⁻¹, but can be found in soils called seleniferous with concentrations of up to 1200 mg kg⁻¹ of It (Fordyce, 2005). It is considered that selenium is essential in humans for its role as cofactor of enzymes related with antioxidant metabolism (Rayman, 2008). In plants selenium has a positive effect on the antioxidant capacity, acting more effectively as selenite than selenate (Cartes *et al.*, 2005). In Mexico studies on the relationship between selenium and nutritional quality of food in terms of its antioxidant capacity are few and therefore the aim of this study was to document the effect of selenium applications on lettuce, checking plant growth, mineral composition of leaves and antioxidant capacity of foliar cell extracts. This under the assumption that the application of this element will modify the cellular redox balance enhancing the antioxidant capacity of plant tissues.

Materials and methods

This research was carried out in the Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) in Saltillo, Coahuila, Mexico, under greenhouse conditions, with an average temperature and relative humidity of 17.8 °C and 68% respectively. Lettuce seeds (*Lactuca sativa*) variety Great Lakes were used, these were placed in germinating trays 200 cavities, using as substrate peat moss and perlite for germination. After 40 days after sowing, seedlings were transplanted in 20 L polyethylene pots using as substrate a mixture of peat moss and perlite with 70:30 V:V. Treatments consisted of foliar application of selenium in concentrations of 0, 5 and 10 mg L⁻¹ at 15, 30 and 45 days after transplantation. Sodium selenite (Na₂SeO₃, Sigma Aldrich, USA) was used as selenium source without mixing with adjuncts.

Leaves from three plants at physiological maturity per treatment at 20 and 35 days after transplanting (DAT) were collected, these were ground, obtaining a fresh leaf extract where the redox potential (ORP) was determined (mV) using a potentiometer HI98185-01 (HANNA, Inc., USA) using the

Se colectaron las hojas con madurez fisiológica de tres plantas por cada tratamiento a los 20 y 35 días después del trasplante (ddt), estas fueron molidas y se obtuvo el extracto fresco foliar en donde se determinó el potencial de óxido-reducción (ORP) (mV), usando un potenciómetro HI98185-01 (HANNA, Inc., USA), usando la técnica descrita por Benavides-Mendoza *et al.* (2002). La actividad catalasa (EC 1.11.1.6) se cuantificó igualmente en las hojas con madurez fisiológica a los 35 días después del trasplante (ddt) siguiendo la técnica de Ramos *et al.* (2010).

Se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis Biomate 5 (Thermo Electron, USA) en 590 nm y los resultados se expresaron en mM de consumo de $\text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ proteínas totales}^{-1}$ (mg/g). El peso fresco de las partes aéreas y de la raíz se determinó a los 50 ddt tomando tres plantas completas por cada tratamiento. Estas se lavaron cuidadosamente y se separó la raíz del tallo y hojas a la altura de la corona. Los pesos fueron medidos con una balanza Adventurer Pro (OHAUS, Inc., USA). Posteriormente las mismas muestras fueron colocadas en una estufa deshidratadora marca Robertshaw a 60 °C durante 72 h para luego ser pesadas en una balanza analítica Pioneer (OHAUS, Inc., USA). Sobre las muestras secas se determinó la concentración de minerales en las hojas.

Para el nitrógeno total se usó la técnica de micro Kjeldhal (AOAC, 1980a), mientras que para el fósforo se utilizó un método espectrofotométrico (AOAC, 1980b), el K, Ca, Mg, Na, Fe, Mn, Cu y Zn fueron medidos por medio de un espectrofotómetro de absorción atómica de la marca Varian AA-1275 siguiendo la técnica de Fick *et al.* (1976). Para la determinación del selenio se hizo primero la digestión de 0.5 g de muestra seca en ácido nítrico concentrado hasta que se eliminó toda la parte orgánica usando un espectrofotómetro de emisión atómica por plasma IRIS ADVANTAGE (THERMO JARRELL, USA). El diseño estadístico fue de bloques completos al azar con tres repeticiones. El análisis de los datos consistió en análisis de varianza y pruebas de medias de Tukey y se llevó a cabo con el programa SAS versión 6.0 (SAS Institute, 2001).

Resultados y discusión

La aplicación de selenio foliar presentó un efecto sustancial sobre el potencial de óxido-reducción (ORP) (Figura 1). Los valores de ORP indican la capacidad antioxidante, es decir,

technique described by Benavides-Mendoza *et al.* (2002). Catalase activity (EC 1.11.1.6) was also quantified in leaves with physiological maturity at 35 days after transplanting (DAT) following Ramos *et al.* (2010) technique.

AUV-Vis Biomate 5 (Thermo Electron, USA) spectrophotometer at 590 nm was used and the results were expressed in mM consumption of $\text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ total}^{-1} \text{ protein}$ (mg/g). Fresh weight of aerial parts and root was determined at 50 DAT taking three full plants per treatment. These were carefully washed and root was separated from stem and leaves at crown height. Weights were measured with an Adventurer Pro (OHAUS, Inc., USA) scale. Then the same samples were placed in a Robertshaw dehydrator oven at 60 °C for 72 h to weigh them on an analytical scale Pioneer (OHAUS, Inc., USA). The dried samples were determined mineral concentration in leaves.

For total nitrogen the micro Kjeldhal (AOAC, 1980a) method was used, while for phosphorus used a spectrophotometric (AOAC, 1980b) method, K, Ca, Mg, Na, Fe, Mn, Cu and Zn were measured through an atomic absorption spectrophotometer Varian AA-1275 following Fick *et al.* (1976) technique. To determine selenium first digesting of 0.5 g of dry sample in concentrated nitric acid until all the organic part using a spectrophotometer of plasma atomic emission IRIS ADVANTAGE (Thermo Jarrell, USA). The statistical design was randomized complete block with three replications. Data analysis consisted of ANOVA and Tukey tests and was carried out with SAS version 6.0 (SAS Institute, 2001).

Results and discussion

Foliar application of selenium has a substantial effect on redox potential (ORP) (Figure 1). ORP values indicate the antioxidant capacity, i.e. the ability of the system under analysis to donate electrons compared to hydrogen electrode (Benavides *et al.*, 2002); as lower the value of ORP greater the capability to donate electrons and work as an antioxidant.

This result is possibly related to an increased antioxidant enzyme activity, which is known to increase in presence of certain selenium concentrations (Freeman *et al.*, 2010). This seems to be confirmed by the results obtained with leaf catalase activity (Figure 2) showing positive and significant trend by applying selenium to plants. These results are similar to those obtained by Lingan *et al.* (2005) who reported a positive effect of selenium on catalase activity.

la capacidad del sistema bajo análisis de ceder electrones en comparación con un electrodo de hidrógeno (Benavides *et al.*, 2002). Mientras más bajo sea el valor de ORP mayor capacidad de ceder electrones y funcionar como antioxidante.

Este resultado se relaciona posiblemente con una mayor actividad enzimática antioxidante, la cual se sabe aumenta en presencia de ciertas concentraciones de selenio (Freeman *et al.*, 2010). Lo anterior parece confirmarse por los resultados obtenidos con la actividad catalasa foliar (Figura 2) que mostró una tendencia positiva y significativa al aplicarse selenio a las plantas. Estos resultados son similares a los obtenidos por Ligan *et al.* (2005) que también reportaron un efecto positivo del selenio sobre la actividad catalasa.

Es probable que el efecto del selenio sobre el potencial antioxidante no se asocie con una mayor actividad fotosintética y tal vez ello explique la ausencia de diferencias en el peso fresco y seco de la raíz y las hojas de las plantas de lechuga en este estudio (Cuadro 1). Bevcort *et al.* (2012) obtuvieron resultados análogos aplicando selenio en tomate, obteniendo un aumento significativo en el estado antioxidante pero sin observar diferencias en los pesos frescos y secos de frutos y raíz entre los distintos tratamientos.

En cuanto al contenido de minerales en las plantas de lechuga (Cuadro 2) únicamente se encontraron diferencias en el contenido de nitrógeno y fósforo al aplicar selenio. Nowak *et al.* (2002) también encontraron un incremento en el contenido de nitrógeno con la aplicación de selenio a plantas de trigo. Los datos obtenidos en cuanto al P coinciden con Wu y Huang (2004), quienes encontraron un incremento de este elemento en plantas de trébol cuando se aplicaron cantidades bajas de selenio aplicando al sustrato 0, 10, 20 y 30 mg kg⁻¹. Respecto a la concentración del selenio se encontró en mayor cantidad en el tratamiento de 10 mg kg⁻¹, Kápolna *et al.* (2009) incrementaron la concentración radical de selenio de 0.045 a 2.0 µg g⁻¹ en peso seco al aplicar 100 mg L⁻¹ de selenio por aspersión foliar. Estos datos coinciden con los de Smrkolj *et al.* (2006) quienes indican la necesidad de llevar a cabo aspersiones repetidas si el objetivo es la acumulación de selenio.

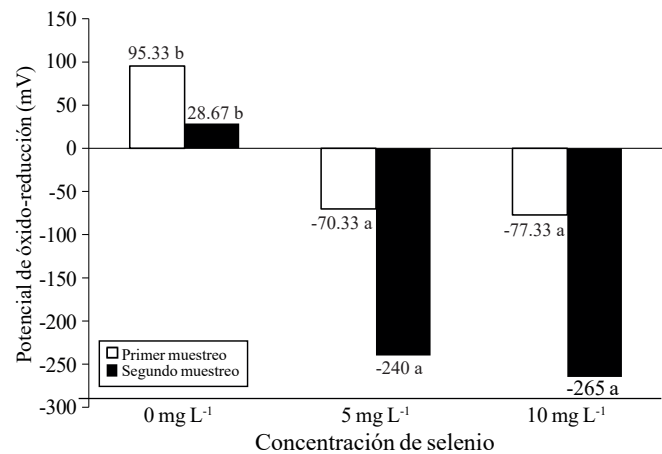


Figura 1. Promedio y desviación estándar del potencial de óxido-reducción (ORP en mV) en el extracto fresco de plántulas de lechuga a las cuales se les aplicó selenio en forma de selenito de sodio. Las barras con distinta literal indican diferencia según Tukey ($p \leq 0.05$).

Figure 1. Average and standard deviation of oxide reduction potential (ORP mV) in fresh lettuce seedlings extract to which was applied selenium as sodium selenite. Bars with different literal difference indicated by Tukey ($p \leq 0.05$).

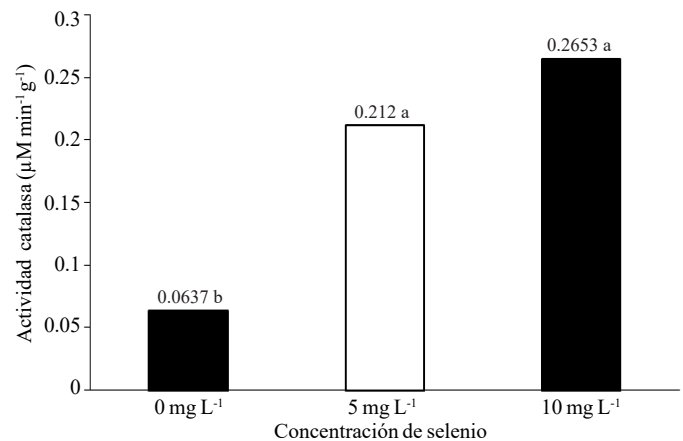


Figura 2. Promedio y desviación estándar de la actividad catalasa en plántulas de lechuga a las cuales se les aplicó selenio en forma de selenito de sodio. Las barras con distinta literal indican diferencia según Tukey ($p \leq 0.05$).

Figure 2. Mean and standard deviation of catalase activity in lettuce seedlings to which was applied selenium as sodium selenite. Bars with different literal difference indicated by Tukey ($p \leq 0.05$).

It is likely that the effect of selenium on the antioxidant potential is not associated with a higher photosynthetic activity and perhaps this explains the lack of differences in

Cuadro 1. Efecto de la aplicación foliar de selenio sobre los pesos frescos y secos de plantas de lechuga.
Table 1. Effect of foliar application of selenium on the fresh and dry weights of lettuce plants.

Tratamiento (mg L ⁻¹)	Peso fresco hojas (g)	Peso fresco raíz (g)	Peso seco hojas (g)	Peso seco raíz (g)
0	865 a [‡]	62.7 a	24.69 a	6.257 a
5	737.3 a	52.77 a	23.78 a	5.453 a
10	686.7 a	45.11 ab	26.27 a	6.62 a

[‡]Promedios seguidos de distintas literales son estadísticamente diferentes según Tukey (P≤0.05).

Cuadro 2. Efecto de la aplicación foliar de selenio sobre la concentración de minerales en hojas de lechuga.
Table 2. Effect of foliar application of selenium on mineral concentration in lettuce leaves.

TRT (mg L ⁻¹)	N (%)	P (%)	K (%)	Ca (%)	Mg (%)	Na (%)	Fe (mg kg ⁻¹)	Zn (mg kg ⁻¹)	Mn (mg kg ⁻¹)	Cu (mg kg ⁻¹)	Se (mg kg ⁻¹)
0	3.03 b [‡]	0.48 b	1.3 a	0.96 a	0.28 ^a	0.73 a	196.7 a	13.3 a	64.3 a	3 a	0 ^b
5	3.62 a	0.53 ab	1.27 a	1.1 a	0.27 a	0.72 a	188.7 a	87 a	21 a	2 a	1.8 b
10	3.64 a	0.58 a	1.08 a	0.67 a	0.25 a	0.84 a	163.7 a	83.33 a	12.6 a	1.3 a	32.6 a

TRT=Tratamiento. [‡]Promedios seguidos de distintas literales son estadísticamente diferentes según Tukey (P≤0.05). [‡]Se consideró un valor de cero en la concentración de Se cuando no fue detectado.

Conclusiones

La aplicación de selenio en forma foliar indujo un mayor estatus antioxidante en las plantas de lechuga, aumentando la concentración de N y P foliar pero sin modificar la concentración de otros elementos ni la biomasa.

La aplicación foliar de selenio puede usarse como una herramienta para elevar la calidad nutricional de la lechuga en términos de antioxidantes.

Agradecimientos

La autora María de Lourdes López Gutiérrez, agradece al CONACYT por el apoyo económico brindado. A la LCQ, Irma O. Solís De la Peña, por los análisis de selenio y al laboratorio de Nutrición Animal de la UAAAN por los análisis de minerales.

Literatura citada

AOAC (Association of official analytical chemists). 1980 a. Official Methods of Analysis 13th edition. Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC., USA. 547-562 pp.

fresh and dry weight of root and leaves on lettuce plants in this study (Table 1). Becvort *et al.* (2012) obtained similar results applying selenium to tomato plants, obtaining a significant increase in antioxidant status but without differences in fresh and dried weight of fruits and root between treatments.

As for mineral content in lettuce plants (Table 2) found differences only in nitrogen and phosphorus content by applying selenium. Nowak *et al.* (2002) found an increase in nitrogen content with the application of selenite in wheat plants. The data obtained regarding P match with Wu and Huang (2004), who found an increase of this element in clover plants when low amounts of selenite was applied to the substrate with 0, 10, 20 and 30 mg kg⁻¹. Regarding the concentration of selenium it was found greater amount in treatment of 10 mg kg⁻¹, Kápolna *et al.* (2009) increasing radical selenium concentration from 0.045 to 2.0 µg g⁻¹ dry weight by applying 100 mg L⁻¹ of selenium by foliar spraying. These data is consistent with Smrkolj *et al.* (2006) who indicate the need to perform repeated spraying if the objective is accumulation of selenium.

Conclusions

The application of selenium as foliar induced a higher antioxidant status in lettuce plants, increasing the concentration of N and P in leaves without changing the concentration of other elements or biomass.

- AOAC (Association of official analytical chemist). 1980 b. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 30th edition. Association of Official Analytical Chemist. Washington, D.C. USA. 39 p.
- Becvort-Azurra, A.; Fuentes-Lara, L. O.; Benavides-Mendoza, A.; Ramírez, H.; Robledo-Torres, V. y Rodríguez-Mendoza, M. N. 2012. Aplicación de selenio en tomate: crecimiento, productividad y estado antioxidante del fruto. *Terra Latinoamericana*. 30:291-301.
- Benavides-Mendoza, A.; Ramírez, H.; Robledo-Torres, V.; Cornejo-Oviedo, E. and Maiti, R. K. 2002. Productivity, CO₂ assimilation, and mineral tissue concentrations in onion plants under colored plastic films. *Crop Research*. 24:26-39.
- Broadley, M. R.; White, P. J. M.; Bryson, R. J.; Meacham, M. C.; Bowen, H. C.; Johnson, S. E.; Hawkesford, M. J.; McGrath, S. P.; Zhao, F. J.; Breward, N.; Harriman, M. and Tucker, M. 2006. Biofortification of UK food crops with selenium. *Proc. Nutr. Soc.* 65:169-181.
- Cartes, P.; Gianfrera, L. and Mora, M. L. 2005. Uptake of selenium and its antioxidative activity in ryegrass when applied a selenate and selenite forms. *Plant Soil*. 276:359-367.
- Fick, K. R.; Miller, S. M.; Funk, J. D.; McDowell, L. R. and Houser, R. H. 1976. Methods of mineral analysis for plant and animal tissues. University of Florida institute of food and agriculture. Sciences, Department of Animal Sciences, Gainesville, FL USA. 81 p.
- Fordyce, F. 2005. Selenium deficiency and toxicity in the environment. pp. 373-415. In: O. Selinus, B. Alloway, J. Centeno, R. Finkelman, R. Fuge, U. Lindh, and P Smedley (Eds.). *Essentials of Medical Geology*. Elsevier. Amsterdam, The Netherlands.
- Freeman J. L.; Tamaoki, M.; Stushnoff, C.; Colin, F.; Cappa, J. D.; Sirine, F.; Matthew, M.; McGrath, S.; Doug-Van, H. and Pilon-Smits, E. A. H. 2010. Molecular mechanisms of selenium tolerance and hyperaccumulation in *Stanleya pinnata*. *Plant Physiol*. 153:1630-1652.

Foliar application of selenium may be used as a tool to improve the nutritional quality of lettuce in terms of antioxidants.

End of the English version



- Kápolna, E.; Hillestrom, P. R.; Laursen, K. H.; Husted, S. and Larsen, E. H. 2009. Effect of foliar application of selenium on its uptake and speciation in carrot. *Food Chem*. 115:1357-1363.
- Lingan, M. W. and Dongling, B. 2005. Selenium modulates the activities of antioxidant enzymes, osmotic homeostasis and promotes the grown of sorrel seedling under salt stress. *Plant Growth Regul.* 45:155-163.
- Ramos S. J.; Faquin, V. L.; Guilherme, R. G.; Castro, E. M; Ávila, F. W.; Carvalho, G. S.; Bastos, C. E. A.; Oliveira, C. 2010. Selenium biofortification and antioxidant activity in lettuce plants fed with selenate and selenite. *Plant Soil Environ*. 12:584-588.
- Rayman, M. P. 2008. Food-chain selenium and human health: emphasis on intake. *Brit. J. Nutr.* 100:254-268.
- SAS Institute. 2001. PROC user's manual. 6th ed. SAS Institute. Cary, NC, USA. 252 p.
- Smrkolj, P.; Germ, M.; Kreft, I. and Stibilj, V. 2006. Respiratory potential and Se compounds in pea (*Pisum sativum* L.) plants grown from Se-enriched seeds. *J. Exp. Bot.* 57:3595-3600.
- Wu, L. and Huang, Z. 2004. Chloride and sulfate salinity effects on selenium accumulation by tall fescue. *Crop Sci*. 31:114-118.
- Nowak, J.; Kaklewski, K. and Ligocki, M. 2004. Influence of selenium on oxidoreductive enzymes activity in soil and in plants. *Soil Biol. Biochem.* 36:1553-1558.