

Investigación de la biotransformación de Se en tejidos de *Phaseolus vulgaris* L. mediante espectroscopia de absorción de rayos X

Gustavo Cruz-Jiménez*, Eunice Yáñez-Barrientos*, Gilberto Gutiérrez-Vázquez**, Jesús Bernal-Alvarado**, Eduardo Durán-Castro*, Susana Figueroa-Gerstetmaier**, Jorge L. Gardea-Torresdey***, Ma. Guadalupe de la Rosa-Alvarez**

RESUMEN

En este trabajo se evaluó la toxicidad del selenato en tres variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.): Negro, Peruano y Flor de Mayo. La variedad Flor de Mayo se identificó como la más resistente por lo que en ella se cuantificó el selenio y se determinó la biotransformación del selenato mediante espectroscopia de absorción de rayos X (EAX). La raíz y tallo de esta variedad acumularon hasta 1 218 mg Se kg⁻¹ y 101 mg Se kg⁻¹, respectivamente. Los resultados de EAX indicaron que parte del selenato se biotransformó en los tejidos de la planta, en donde se identificaron las formas selenato y selenuro. De acuerdo a estos resultados, esta variedad de *P. vulgaris* puede ser clasificada como una acumuladora secundaria de selenio; por otro lado se comprobó la biotransformación del selenato usando EAX lo cual, hasta donde sabemos, no ha sido previamente reportada en la literatura.

ABSTRACT

In this investigation, selenate toxicity was evaluated in three varieties of *Phaseolus vulgaris* L.: Negro, Peruano, and Flor de Mayo, where this last was identified as the most resistant to selenate. In the Flor de Mayo variety, Se in plant tissues was quantified and X-ray absorption spectroscopy (XAS) analysis performed in order to determine the potential selenate biotransformation. Root and stem tissues accumulated up to 1 218 mg Se kg⁻¹ and 101 mg Se kg⁻¹, respectively. XAS results indicated that part of the selenate was biotransformed, as in plant tissues selenate as well as selenide forms were identified. According to these results, Flor de Mayo variety can be classified as a Se secondary accumulator. Also, selenate biotransformation was identified. To our knowledge, this is the first time selenate biotransformation using XAS in this plant species is reported.

Recibido: 30 de mayo de 2011
Aceptado: 27 de julio de 2011

INTRODUCCIÓN

El Se es un elemento esencial en humanos y animales cuya deficiencia puede provocar cardiopatías (Casarett y Doull, 2001). En el reino vegetal solo se ha demostrado su necesidad en algunas algas (Trelease y Trelease, 1939; Price *et al.*, 1987) pero no en plantas superiores, no obstante, se ha clasificado como un elemento benéfico para el crecimiento de algunas especies vegetales (Pilon-Smits *et al.*, 2009a). Se ha reportado además que existen plantas que podrían ser utilizadas para remediar ambientes contaminados con este elemento debido a las concentraciones que absorben y toleran (Pilon-Smits *et al.*, 2009b).

El Se se encuentra en la naturaleza y en sistemas biológicos como selenato (Se⁶⁺), selenito (Se⁴⁺), selenio elemental (Se⁰) y selenuro (Se⁻²). Tanto la biodisponibilidad como el potencial tóxico del Se y sus compuestos son determinados por la forma química, y un factor importante es la solubilidad de éstos. En cuanto a plantas, el Se puede ser absorbido como selenato, selenito y selenio orgánico. Tanto el selenato como el selenio orgánico se encuentran activos metabólicamente, mientras que el selenito puede permanecer como componente pasivo. Las formas orgánicas del Se son más disponibles para las plantas que las formas inorgánicas. Las especies químicas del selenio influyen en la traslocación y distribución entre las diferentes partes de la planta. Una vez dentro de la planta, el Se es metabolizado por enzimas encargadas de la asimilación de S (Frankenberger, 1998).

Palabras clave:

Selenato; *Phaseolus vulgaris*; espectroscopia de absorción de rayos X; toxicidad; biotransformación.

Keywords:

Selenate; *Phaseolus vulgaris*; X-ray absorption spectroscopy; toxicity; biotransformation.

*División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato, Col. N. Alta s/n, Guanajuato, Gto., México. C.P. 36050. Correo electrónico: cruzg@ugto.mx

**División de Ciencias e Ingenierías, Campus León, Universidad de Guanajuato, Loma del Bosque No. 103, Col. Lomas del Campestre, León, Gto., México. C.P. 37150.

***Chemistry Department and Environmental Science and Engineering Ph.D. Program, The University of Texas at El Paso, 500 W. University Ave. 79968, El Paso, TX, USA.

Como en el caso de otros contaminantes, el Se entra al medio ambiente debido a diversos factores que pueden ser naturales o antropogénicos. Así, en algunas partes del mundo se han reportado problemas de contaminación por este elemento (Nriagu & Wong, 1983; Seiler *et al.*, 1999) por lo que su remediación ha sido tema de variadas investigaciones. En el estado de Guanajuato se han detectado concentraciones de selenio entre 27 mg kg⁻¹ - 38 mg kg⁻¹ en algunos jales (Mendoza-Amézquita *et al.*, 2006). Si bien estas concentraciones se encuentran por debajo de lo que establece la normatividad mexicana (390 mg kg⁻¹, Proy-NOM, 2004), es necesario considerar otras fuentes potenciales de contaminación incluyendo deposición atmosférica y riego con aguas que contienen éste y otros elementos potencialmente tóxicos.

El conocimiento de los efectos tóxicos potenciales del Se en diversas especies vegetales es importante si se pretendiera aplicar fitorremediación a estos terrenos para recuperación o remediación. Por otro lado, considerando cultivos importantes destinados a la alimentación humana y animal, si el contaminante no se transportara hasta la parte comestible, sería posible remediar el sitio y producir alimentos.

A nivel mundial se han realizado investigaciones de algunas plantas que pueden ser potencialmente útiles para uso en fitorremediación. Por ejemplo, un estudio realizado en *Convolvulus arvensis* L, una maleza introducida en México y que puede ser encontrada en el norte del país, reporta que esta planta acumula en la parte aérea 3 800 mg kg⁻¹ de Cr, 1 500 mg kg⁻¹ de Cd y 560 mg kg⁻¹ de Cu en tejido seco (Gardea-Torresdey *et al.*, 2004). Los resultados indican que esta especie puede ser potencialmente utilizada con fines de fitorremediación en suelos que se encuentren contaminados con estos metales. En el caso del Se, se ha sugerido que *C. arvensis* L. puede ser utilizada para lugares donde la contaminación de este elemento sea moderada (menor a 5 mg kg⁻¹) y donde la concentración de S no afecte la absorción de dicho elemento (Cruz-Jimenez *et al.*, 2005; Peralta-Videa *et al.*, 2000). Se han realizado importantes esfuerzos para determinar la distribución y biotransformación de Se en plantas utilizando diversas técnicas. Por ejemplo, para el caso de la distribución en *P. vulgaris* y *Vicia faba*, Arvy (1982) ha reportado el uso de autoradiografías. Para determinar la distribución y especiación de este elemento en *Glycine max*, Chan y colaboradores (2010), utilizaron cromatografía líquida de alta resolución asociada a espectroscopia de masas con plasma acoplado inductivamente (HPLC-ICP/MS) y espectrometría de masas con trampa de iones acoplado a un ionizador por electrospray (ESI-ITMS), mientras que en *Astragalus bisulcatus*, Pickering y colaboradores, (2000) utilizaron EAX para el mismo fin. Esta última

técnica ha probado tener diversas ventajas debido a que prácticamente la muestra a analizar no necesita pretratamiento. El objetivo del presente proyecto fue evaluar la capacidad del frijol (*Phaseolus vulgaris*. L) para absorber y tolerar Se en forma de selenato, así como la posible biotransformación. Se exploraron tres variedades: peruano, flor de Mayo y negro con el fin de identificar la variedad más tolerante a este compuesto. Para estudios de biotransformación se utilizó la espectroscopia de absorción de rayos X (EAX).

METODOLOGÍA

Se preparó una solución Hoagland modificada de acuerdo a Peralta y colaboradores (2001). A esta solución nutritiva se le agregaron diferentes cantidades de selenio en forma de selenato para obtener concentraciones finales de 0 mg Se L⁻¹, 5 mg Se L⁻¹, 10 mg Se L⁻¹, 20 mg Se L⁻¹, 40 mg Se L⁻¹, 80 mg Se L⁻¹, 160 mg Se L⁻¹, 320 mg Se L⁻¹. Después de ajustar el pH a 5.8 se le adicionó Phytigel®. La mezcla se esterilizó en autoclave y se vació en recipientes de plástico previamente esterilizados. Se utilizaron las variedades Peruano, Flor de Mayo y Negro para fines comparativos. Las semillas se trataron con solución de NaClO al 4 % durante 30 min con agitación constante y se colocaron en el medio solidificado. Los recipientes con las semillas plantadas se transfirieron a una cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 12/12 y se cosecharon después de 10 días.

Al tiempo de cosecha, las plántulas se lavaron con HCl 0.01M y se enjuagaron con agua deionizada. Se evaluó el porcentaje de germinación de la semilla y se midió el crecimiento de la raíz, tallo y hoja. La clorofila en las hojas jóvenes se cuantificó utilizando un medidor de clorofila electrónico (SPAD-502 Chlorophyll Meter, Minolta Co. Ltd, Osaka, Japan). Las plántulas divididas en raíz, tallo y hoja se deshidrataron, se molieron y se pasaron por un tamiz del No. 20. Posteriormente, 0.1 g de tejido se digirió usando 6 mL de HNO₃ concentrado y un digestor de Microondas (Microwave Sample Preparation System. Multiwave 3000 Perkin Elmer). Una vez obtenidas las muestras totalmente digeridas, se realizó un análisis cuantitativo por Espectroscopia de Emisión Atómica con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-OES; Optima 4300 DV, Perkin Elmer) a una longitud de onda de 196.026 nm.

Para la EAX, al tiempo de la cosecha y después de ser apropiadamente lavadas, las plantas fueron divididas en raíz y tallo. Posteriormente se congelaron durante 24 h y se liofilizaron por 72 h. Una vez seco el material, se molió en un mortero de ágata y las muestras se montaron en placas de aluminio de 1 mm de espesor y se sellaron con cinta Kapton. Las muestras

fueron analizadas en el Laboratorio de Luz Sincrotrón a cargo de la Universidad de Stanford (SSRL por sus siglas en inglés) en la línea 7-3. Para obtener los espectros de fluorescencia se utilizó un detector de Germanio de 30 canales con las siguientes condiciones de operación: una corriente entre 60 mA -100 mA, energía de 3.0 GeV, un monocromador de Si de doble cristal (Si 220), apertura de 1 mm. Se utilizaron como compuestos modelo el selenato de sodio, selenito de sodio y selenuro de sodio, con el fin de determinar las energías de absorción de los diferentes estados de oxidación para fines comparativos con las muestras.

Para el análisis de datos se utilizó el programa WinXAS 3.1. Para ello, la extracción de la región cercana al borde de absorción (XANES, X-ray absorption near edge structure) de los espectros se realizó calibrando con un estándar interno de Se⁰ a la energía de 12.658 keV. Se obtuvo la segunda derivada del espectro de Se⁰ y la energía se corrigió de acuerdo al punto de inflexión del Se⁰. Posteriormente se sustrajo la línea base utilizando una aproximación polinomial de primer grado para la región pre-edge y una de segundo grado para la región pos-edge y los espectros fueron normalizados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la concentración de selenato en la elongación de tejidos y producción de clorofila

En la presente investigación, la toxicidad del selenato se midió como el efecto de la concentración de éste en el crecimiento de raíz, tallo, hojas y producción de clorofila. Con el fin de determinar cuál variedad de *P. vulgaris* presenta mayor tolerancia al selenato, se hizo una comparación estadística de los resultados obtenidos (figuras 1-4). La figura 1 presenta los resultados de elongación de raíz. Se observa que no hubo diferencias significativas en el tamaño de raíz entre la variedad Negro y la variedad Flor de Mayo. Sin embargo, sí se observaron diferencias con respecto a la variedad Peruano, el cual mostró la menor longitud de raíz de las tres analizadas en este trabajo. A la mayor concentración utilizada en la presente investigación (320 mg Se L⁻¹), el tamaño de raíz fue de 0 mm, 9.3 mm y 15 mm para las variedades Peruano, Negro y Flor de Mayo, respectivamente. Se observa a su vez, que la presencia de selenato disminuye la elongación de este órgano en las variedades Negro y Flor de Mayo, en comparación con las plantas control. Dicho efecto es menor para la variedad Peruano. El aspecto más importante que se registra en esta comparación es que la variedad Flor de Mayo es la que posee significativamente la elongación más grande de la raíz en todos los tratamientos. De acuerdo a esto, podríamos suponer que la raíz de esta variedad presenta mayor resistencia que la de las otras variedades a la presencia de selenio en la forma de selenato.

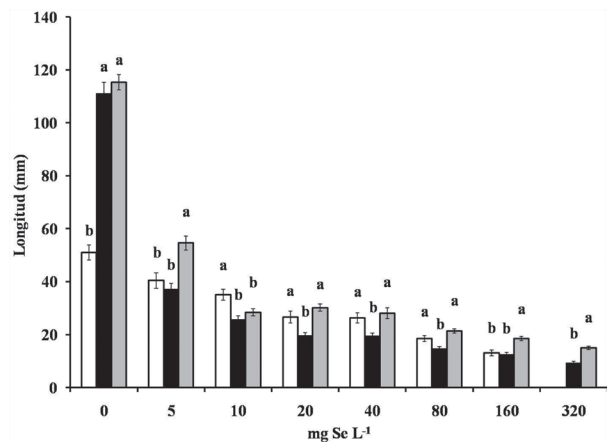


Figura 1: Efecto de la concentración de Se (como selenato) en la elongación de raíz de *P. vulgaris* variedades (a)□Peruano, (b)■Negro y (c)▨Flor de Mayo. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) en el tamaño de raíz de las diferentes variedades para cada tratamiento.

En la figura 2 se observa que para cada tratamiento, el orden decreciente de elongación de tallo fue Negro < Flor de Mayo < Peruano. De acuerdo a esto, en los tallos la mayor resistencia al selenato se observó en la variedad Negro. El desarrollo de hojas se observó en concentraciones por debajo de los 20 mg Se L⁻¹ en las variedades Peruano y Negro. Sin embargo, a esta concentración la variedad Flor de Mayo no fue capaz de desarrollar esta parte de la planta, lo que puede representar un signo de toxicidad. Con respecto a las hojas, el tamaño de éstas no presenta diferencias significativas ($P < 0.05$) en los controles de las tres variedades (figura 3). Sin embargo, las diferencias comienzan a observarse a partir del tratamiento de 5 mg L⁻¹, en donde se ve favorecida la variedad Flor de Mayo, tendencia que se conserva en la concentración de 10 mg L⁻¹.

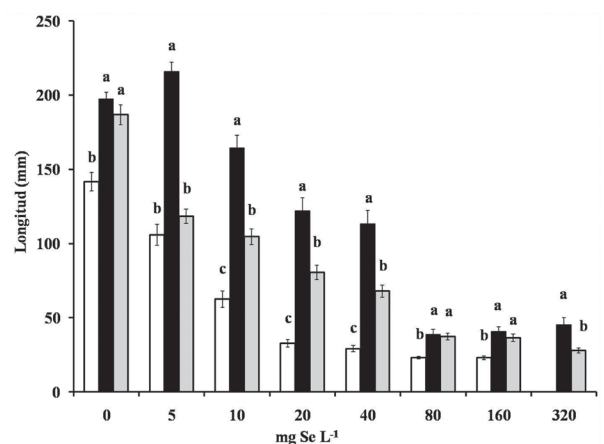


Figura 2: Efecto de la concentración de Se (como selenato) en la elongación de tallo de *P. vulgaris* variedades (a)□Peruano, (b)■Negro y (c)▨Flor de Mayo. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) en el tamaño de tallo de las diferentes variedades para cada tratamiento.

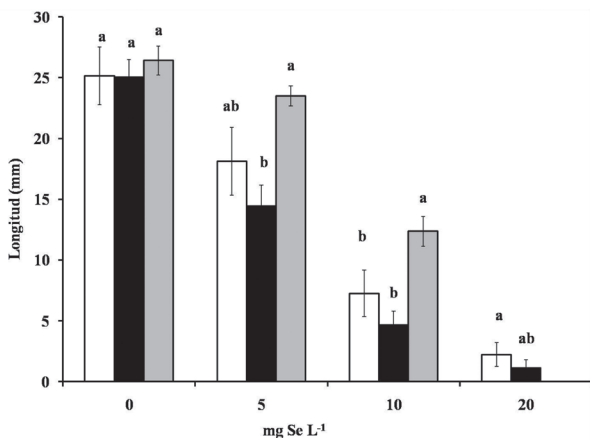


Figura 3: Efecto de la concentración de Se (como selenato) en la elongación de hoja de *P. vulgaris* variedades (a) □ Peruano, (b) ■ Negro y (c) ▒ Flor de Mayo. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) en el tamaño de hoja de las diferentes variedades para cada tratamiento.

En cuanto a la producción de clorofila (figura 4), se observó un comportamiento similar al que se encontró en el análisis de hojas. El contenido de clorofila en los controles, al igual que en la elongación de las hojas, no presenta diferencias significativas. Sin embargo, en las concentraciones de 5 mg L⁻¹ y 10 mg L⁻¹ hay diferencias que indican que las hojas de la variedad Flor de Mayo tienen mayor contenido de clorofila que las hojas de las otras variedades.

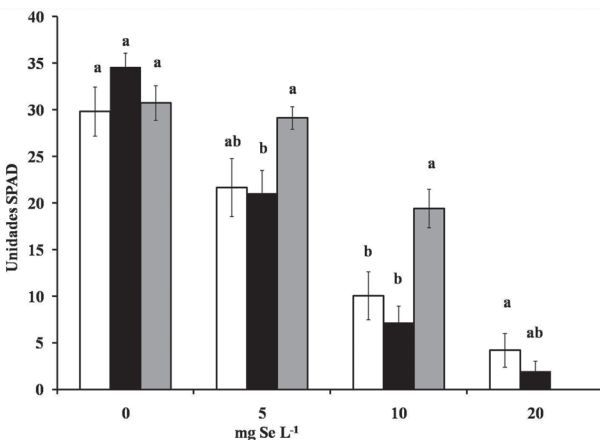


Figura 4: Efecto de la concentración de Se (como selenato) en la producción de clorofila en plantas de *P. vulgaris* variedades (a) □ Peruano, (b) ■ Negro y (c) ▒ Flor de Mayo. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) en clorofila de las diferentes variedades para cada tratamiento.

Una de las diferencias entre las plantas acumuladoras de selenio y las que no acumulan, es que las primeras no presentan síntomas de daño severo en su anatomía mientras que las segundas presentan efectos tóxicos por la presencia del mismo. La habilidad de las plantas hiperacumuladoras es que tienen la

habilidad de contener grandes cantidades de selenio además de poseer un mecanismo de detoxificación. Los principales efectos de toxicidad por selenio que registran algunas plantas es clorosis en hojas (manchas blancas) e inhibición del crecimiento de los tejidos (Rosenfeld y Beath, 1964).

Para el caso de *P. vulgaris*, al estar en contacto con selenato se observaron algunos signos de toxicidad. Una primera indicación de esto fue la inhibición del crecimiento de los tejidos de la planta. Como los resultados lo mostraron, no todas las variedades de *P. vulgaris* con las que se trabajó presentaron la misma tolerancia a la presencia de selenato. De manera general, se observó que la variedad Peruano fue la que menos toleró la presencia de este compuesto, mientras que la variedad que presentó mejor crecimiento de sus tejidos fue Flor de Mayo al tener en casi todos los tratamientos mayor elongación de sus tejidos así como mayor contenido de clorofila en sus hojas. Como los datos lo indicaron, la presencia de selenato disminuyó considerablemente la producción de clorofila en las variedades estudiadas. Es probable que la disminución en el crecimiento de esta planta se deba a que el proceso de fotosíntesis es afectado. Otros investigadores han encontrado datos que apoyan esta hipótesis. Por ejemplo, Geoffroy y colaboradores (2007), observaron daño estructural en cloroplastos del alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* expuesta a selenato, en donde también observaron disminución del crecimiento en presencia del compuesto mencionado. Hasta donde sabemos no existen otras investigaciones acerca de la toxicidad de selenato en *P. vulgaris*.

Acumulación de Se en tejidos de *P. vulgaris*

De acuerdo a los resultados anteriores, la cuantificación de Se (cuando la planta fue alimentada con selenato) se realizó en la variedad Flor de Mayo, la forma de selenito no se consideró debido a que esta variedad presentó mayor efecto tóxico y no se pudo obtener suficiente tejido para realizar la cuantificación. La figura 5 muestra que la raíz acumula más selenio que el tallo en todos los tratamientos. Las concentraciones de selenio en este tejido se muestran en un rango de 51 mg kg⁻¹ a 101 mg kg⁻¹, mientras que en raíz fueron entre 622 mg kg⁻¹ y 1 218 mg kg⁻¹. Avry (1982), había demostrado mediante autoradiografías que en la variedad "Contender" de *P. vulgaris*, el Se se acumula en la raíz y que las hojas actúan como órganos de redistribución de este elemento. Es posible que en la variedad estudiada en la presente investigación ocurra esto, sin embargo es necesario realizar estudios adicionales como micrografía con EAX para determinar esto. De acuerdo a estos resultados, *P. vulgaris*

variedad Flor de Mayo puede ser clasificada como una acumuladora secundaria de acuerdo a lo propuesto por Rosenfeld y Beath (1964). Tomando en cuenta los efectos fitotóxicos y la acumulación, es muy posible que esta planta pueda crecer en lugares cuya concentración biodisponible de selenio en suelo sea menor de 20 mg kg⁻¹.

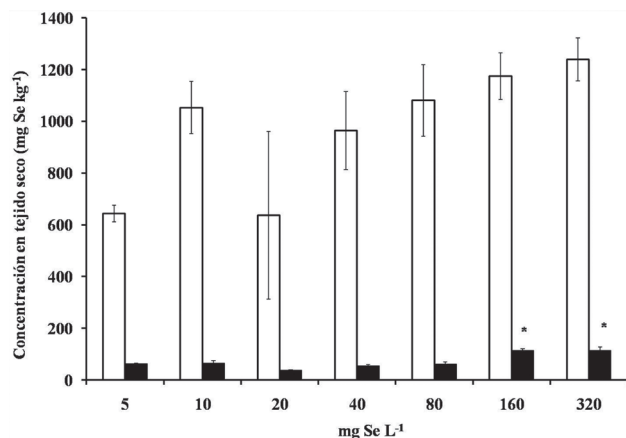


Figura 5: Concentración de Se en (a) □raíz y (b) ■ tallo de *P. vulgaris* variedad Flor de Mayo expuesta a diferentes concentraciones de selenio (como selenato). El asterisco etiqueta diferencias significativas ($P < 0.05$).

Biotransformación de selenato en tejidos de *P. vulgaris*

Existen diversas técnicas analíticas que han sido útiles para determinar la especiación y distribución de Se en plantas (Arvy, 1982; Chan *et al.*, 2010; Smrkoj *et al.*, 2007). Sin embargo, la EAX presenta diversas ventajas debido a que permite analizar muestras sin modificaciones sustanciales de la matriz ya que se requiere un mínimo pretratamiento (Gardea-Torresdey *et al.*, 2005). Con EAX se pueden determinar estados de oxidación de los elementos que se analizan y además proporciona información sobre el ambiente de coordinación. Esto permite estudiar posibles biotransformaciones de los elementos en los diferentes tejidos de las plantas.

La figura 6 muestra los espectros de absorción de rayos X en la región cercana al punto de absorción (XANES) para los compuestos modelo (a) selenuro de sodio, (b) selenito de sodio y (c) selenato de sodio. Se observa el desplazamiento en la absorción de acuerdo al estado de oxidación del selenio. Así, para el selenuro, la absorción se encuentra aproximadamente en 12.6607 keV, para el selenito en 12.6636 keV, mientras que para el selenato se encuentra alrededor de 12.6673 keV. Estas pequeñas diferencias apoyan la identificación del estado de oxidación de los elementos en las muestras que se analizan.

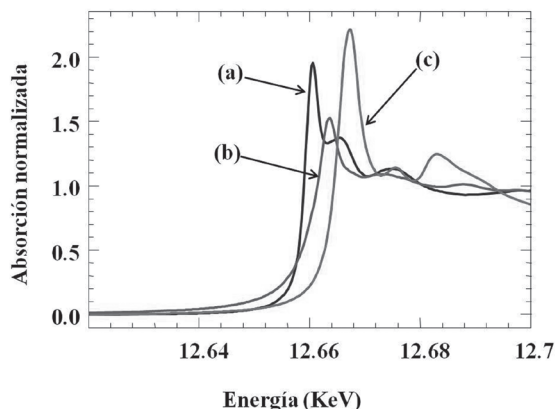


Figura 6: Espectro XANES para (a) selenuro de sodio, (b) selenito de sodio y (c) selenato de sodio.

En la figura 7 se observan los espectros XANES para los compuestos modelo (a) selenuro de sodio, (b) selenito de sodio y (c) selenato de sodio así como para las muestras de (d) raíz y (e) tallo de *P. vulgaris* variedad Flor de Mayo que se creció en selenato de sodio. Se observa el ligero desplazamiento en la absorción que se mostró anteriormente en la figura 6 para los diferentes estados de oxidación del selenio. Los espectros de *P. vulgaris* muestran claramente dos picos de absorción. El primero de ellos coincide con el pico del selenuro (línea vertical gris) y el segundo al pico del selenato (línea vertical negra). Esto indica una biotransformación de selenato a algunas formas químicas selenoorgánicas relacionadas con el selenuro, las cuales son más biodisponibles que el selenato (Levander *et al.*, 1983). Por lo tanto, la biomasa de esta planta se podría utilizar como biofortificador de Se y si en las semillas de esta planta se encontraran estas mismas especies selenadas, su valor nutricional se vería incrementado.

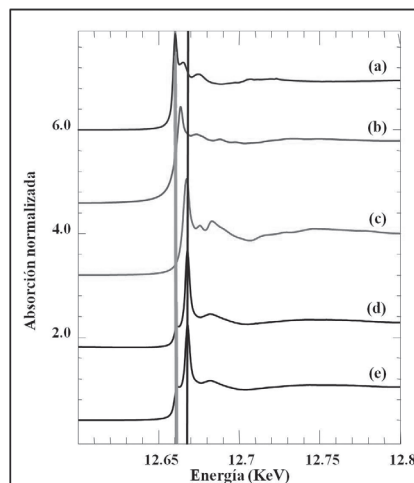


Figura 7: Espectro XANES para los compuestos modelo (a) selenuro de sodio, (b) selenito de sodio, (c) selenato de sodio y para (d) raíz y (e) tallo de *P. vulgaris* variedad Flor de Mayo expuesta a 5 mg Se L⁻¹ (como selenato).

Reportes previos han demostrado que cuando el *Convolvulus arvensis*, una maleza del desierto, se alimenta con selenato o selenito, un cierto porcentaje de éstos se convierte a formas organoselenadas (Cruz-Jiménez *et al.*, 2005). Hay evidencia importante que indica que las plantas absorben el selenato por la misma vía mediante la cual absorben el sulfato, el cual es un nutriente importante para ellas (Barak y Goldman, 1997). En el proceso de biotransformación del selenato, un paso intermedio involucra la reducción a selenito y posteriormente a las formas organoselenadas (Setya *et al.*, 1996). Asombrosamente, Pickering *et al.*, (2003) identificaron la Se-metil-seleno-cisteína (una forma organoselenada) en hojas jóvenes de *Astragalus bisulcatus*, mientras que en hojas maduras se identificaron tanto el selenato como la Se-metil-seleno-cisteína. Esta última es una forma que es tolerada en grandes cantidades por especies *Astragalus* que son hiperacumuladoras de Se. En el caso de *P. vulgaris*, los resultados de la presente investigación demuestran la existencia de selenuro, el cual es muy probable que se encuentre en las formas organoselenadas. Sin embargo, se requiere tener los compuestos modelo adecuados con el fin de realizar un análisis apropiado para determinar con mayor exactitud el tipo de compuesto del cual forma parte el selenio. No obstante, en el presente trabajo se ha demostrado la biotransformación del selenato a formas químicas reducidas relacionadas con el selenuro en *P. vulgaris* variedad Flor de Mayo, utilizando la técnica de EAX.

CONCLUSIONES

Se determinó que *P. vulgaris* variedad Flor de Mayo presenta mayor tolerancia al selenato que las variedades Negro y Peruano. Por lo tanto, es un precandidato para realizar experimentaciones piloto en pruebas de fitorremediación de este elemento. En el presente trabajo las plántulas se expusieron a los tratamientos por diez días. Debido a que el frijol es una especie comestible, parte importante de la dieta de los mexicanos, será importante evaluar la absorción de selenio cuando las plantas se dejan hasta el estado de madurez, y determinar si este elemento se trasloca de forma importante a las semillas. Esta información será determinante para decidir si esta especie es un candidato fitorremediador o si se debería controlar su cultivo en lugares con altas concentraciones de Se. Otra posibilidad sería utilizar esta planta para remediar áreas contaminadas con Se y utilizarla como forraje para alimentar ganado que muestra deficiencia de este elemento, proceso conocido como biofortificación.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Guanajuato, a través de la Dirección de Apoyo a la Investigación y Posgrado, al Consejo de Ciencia y Tecnología del estado de Guanajuato (06-16-k117-96 y 06-16-k117-55) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CB 61649). Guadalupe de la Rosa agradece a la Coordinación de Apoyo a la Investigación y al Posgrado del Campus Guanajuato los fondos proporcionados para realizar una estancia en el *Stanford Synchrotron Radiation Laboratory*. Parte de esta investigación se realizó en el *Stanford Synchrotron Radiation Laboratory*, un laboratorio Nacional de los Estados Unidos operado por la Universidad de Stanford en nombre del US Department of Energy (DOE), de la oficina de Ciencias Básicas en energía. El Programa de Biología Molecular del SSRL es soportado por el Departamento de Energía, la Oficina de Investigación Ambiental y Biológica y por los Institutos Nacionales de Salud, el Centro Nacional de Investigación en Recursos y el Programa de Tecnología Biomédica.

REFERENCIAS

- Arvy MP (1982), *Physiologia Plantarum*, 56, 299-302
- Barak, P., Goldman, I. L. (1997), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1290-1294
- Casarett and Doull's (2001). *Toxicology: The Basic Science of poisons*. Chapter 23 toxic effects of metals. Mc Graw Hill USA, pp 845-847
- Chan Q., Afton S. E., Caruso J. A. (2010), *Metallomics* 2-2, 147-153
- Cruz-Jimenez G., Peralta-Videa J. R., de la Rosa G., Meitzner G., Parsons J. G., Gardea-Torresdey J.L. (2005). *Environmental Chemistry*. 2-100-107
- Frankenberger, William T. Jr; Engberg Richard A. (1998), *Environmental Chemistry of Selenium*. Marcel Dekker, Inc., USA Caps 29 and 30 pp: 613-656
- Gardea-Torresdey, J. L., Peralta-Videa, J. R., Montes, M., de la Rosa, G., Corral-Días, B. (2004) *Bioresource Technology* 92, 229-235
- Gardea-Torresdey, J. L., Peralta-Videa, J. R., de la Rosa, G., Parsons, J. G. (2005) *Coordination Chemistry Reviews*, 249, 1797-181
- Geoffroy, L., Gilbin, R., Simon, O., Floriani, M., Adam, C., Pradines, C., Cournac, L., Garnier-Laplace, J. G. (2007) *Aquatic Toxicology*, 83-2, 149-158
- Levander, O. A., Alfhan, G., Arvilommi, H., Gref, C. G., Huttunen, J. K., Kataja, M., Koivistoinen, P., Pikkarainen, J. (1983) *The American Journal of Clinical Nutrition*, 37-6, 887-897
- Mendoza-Amezquita E., Armienta-Hernandez M.A., Ayora C., Soler A., Ramos-Ramirez E. (2006). *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*. 23-1, 75-83.
- Nriagu, J. O., Wong, H. K. (1983). Selenium pollution of lakes around the smelters at Sudbury, Ontario. *Nature* 301, 55 - 57

- Peralta J. R., Gardea-Torresdey J. L., Tiemann K. J., Gomez E., Arteaga S., Rascon E., Parsons J.G. (2000). *Proceedings of the 2000 Conference on Hazardous Waste Research*. pp. 135-140.
- Peralta, J. R. Gardea-Torresdey, J. L., Tiemann, K. J. Gómez, E., Arteaga, S., Rascon, E., Parsons, J. G. (2001). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 66, 727-734.
- Pickering I. J., Prince R. C., Salt D. E., George G. N., (2000), Proceedings of the National Academy of Sciences USA 97-20, 10717-10722. Pickering, I.J., Wright, C., Bubner, B., Ellis, D., Persans, M. W., Yu, Y., George, G. G., Prince, R. C., Salt, D. E. (2003). *Plant Physiology*, 131, 1460-1467
- Pilon-Smits, E. A. H., Quinn, C. F., Tapken, W., Malagoli, M., Schiavon, M. 2009a. Physiological functions of beneficial elements, *Current Opinion in Plant Biology*, 12-3, 267-274
- Pilon-Smits, E. A, LeDuc, D. L. 2009b. Phytoremediation of selenium using transgenic plants, *Current Opinion in Biotechnology*, 20-2, 207-212.
- Price, N. M., Thompson, P. A., Harrison, P. J. 1987. Selenium: an essential element for growth of the coastal marine diatom *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophycear), *Journal of Phycology*, 23-2, 1-9.
- PROY-NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, Proyecto de Norma Oficial Mexicana, que establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plomo, selenio, talio y vanadio. *Diario Oficial de la Federación*, 2005.
- Rosenfeld I., Beath O. A. (1964). *Selenium: Geobotany, biochemistry, toxicity and nutrition*. Academic Press, New York, N.Y. pag. 91-93.
- Seiler, R. L., Skorupa, J. P., Peltz, L. A. (1999). Areas Susceptible to Irrigation-Induced Selenium Contamination of Water and Biota in the Western United States, U.S. *Geological Survey Circular* 1180.
- Setya A., Murillo M., Leustek T. (1996). Sulfate reduction in higher plants: molecular evidence for a novel 5'-adenylylsulfate reductase, *Proceedings of the National Academy of Science USA* 93, 13383-13388
- Smrkolj P., Osvald M., Osvald J., Stibilj V. (2007), *European Food Research and Technology* 225-2, 233-237
- Trelease, S. F., Trelease, H. M. 1939. Physiological differentiation in *Astragalus* with reference to selenium, *American Journal of Botany*, 26, 530-535