

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



**EFFECTO DE LA INTERACCION NITRÓGENO- AZUFRE- SELENIO
SOBRE EL SISTEMA ANTIOXIDATIVO DE PLANTAS DE *Lolium
perenne* L. PROVENIENTES DE SEMILLAS PELETIZADAS CON
SELENITO**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Ingeniero Agrónomo.

ISIS PALOMA VEGA ARAYA

TEMUCO – CHILE

2012

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



**EFECTO DE LA INTERACCION NITRÓGENO- AZUFRE- SELENIO
SOBRE EL SISTEMA ANTIOXIDATIVO DE PLANTAS DE *Lolium
perenne* L. PROVENIENTES DE SEMILLAS PELETIZADAS CON
SELENITO**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Ingeniero Agrónomo.

ISIS PALOMA VEGA ARAYA

PROFESOR GUIA: PAULA ANDREA CARTES INDO

TEMUCO – CHILE

2012

**EFFECTO DE LA INTERACCION NITROGENO- AZUFRE- SELENIO SOBRE EL SISTEMA
ANTIOXIDANTE DE PLANTAS DE *Lolium perenne* L. PROVENIENTES DE SEMILLAS
PELETIZADAS CON SELENITO**

PROFESOR GUIA

PAULA ANDREA CARTES INDO

DOCTORA EN CS. DE RECURSOS
NATURALES

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS

QUÍMICAS Y RECURSOS NATURALES

PROFESORES CONSEJEROS

ROLANDO EMILIO DEMANET FILIPPI

INGENIERO AGRÓNOMO

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN
AGROPECUARIA

CALIFICACION PROMEDIO TESIS :

A MI MADRE, POR SU AMOR Y APOYO.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por estar Siempre en mi camino y mis decisiones...

A mi Madre por su apoyo incondicional y paciencia durante esta larga etapa, a mi Hermana Ignacia por su cariño y buena voluntad y en especial a mi Hijo Luciano por su comprensión, amor y compañía.

Quisiera agradecer de forma especial a mi tutora de tesis la Doctora Paula Cartes Indo, por haber contribuido en forma significativa en mi formación profesional y darme la oportunidad de realizar mi tesis junto a ella inserta en su proyecto de iniciación FONDECYT N° 11080215. Agradezco sinceramente su tiempo, dedicación, apoyo y confianza durante la última etapa de mi carrera.

Al Sr. Rolando Demanet Filippi, por su contribución en mi formación académica como docente y cotutor de mi tesis. Gracias por su buena disponibilidad al atender siempre mis dudas y solicitudes.

Al cuerpo docente y administrativo de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales, en especial a la Directora de Carrera de Agronomía Sra. Emma Bensch Tapia, por guiarme y brindarme ayuda en mis momentos difíciles, a la Sra. Fresia Cantero por su colaboración y cariño a lo largo de mi carrera.

A las personas del Laboratorio de Análisis de Suelo y Plantas de la Universidad de La Frontera, Sra. Brígida Sobarzo, Evelyn Sothmann, Fanny Pierce, Cecilia Paredes, por su cálida acogida y colaboración durante la parte experimental de mi trabajo de tesis.

INDICE

CAPITULO		PAGINA
1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Hipótesis	3
1.2	Objetivo general	3
1.3	Objetivos específicos	4
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1	Caracterización de la especie <i>Lolium perenne</i>	5
2.2	Importancia del selenio como micronutriente	7
2.3	Formas de selenio en el sistema suelo-planta-animal	10
2.3.1	Comportamiento del Se en el suelo	10
2.3.2	Absorción, asimilación y translocación del Se en las plantas	11
2.3.3	Importancia del selenio en el animal	12
2.4	Absorción y asimilación del nitrógeno en las plantas	13
2.5	Metabolismo del azufre en las plantas	15
2.6	Interacción nitrógeno-selenio en las plantas	17
2.7	Interacción azufre-selenio en el sistema suelo-planta	18
2.8	Selenio y estrés oxidativo de las plantas	20
2.9	Reacción de la peroxidación lipídica	21
2.10	Mecanismos de defensa antioxidantes	22

3	MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1	Características del suelo	24
3.2	Selección del cultivar en estudio	25
3.3	Tratamientos	25
3.4	Establecimiento del ensayo	26
3.5	Fertilización	27
3.6	Peletización	28
3.7	Cosecha	29
3.8	Análisis químicos y bioquímicos	31
3.8.1	Análisis de suelo y foliar	31
3.8.2	Análisis de selenio en tejidos vegetales	31
3.8.3	Determinación de la peroxidación lipídica	32
3.8.4	Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes	32
3.8.5	Determinación de la capacidad antioxidante	33
3.8.6	Análisis Estadístico	34
4	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	35
4.1	Características químicas del suelo del ensayo	35
4.2	Efecto de la relación N-S-Se sobre la materia seca	37
4.3	Determinación de las concentraciones de selenio, azufre y nitrógeno foliar	38

4.4	Efecto de la interacción N-S-Se sobre la actividad antioxidante en <i>Lolium perenne</i> .	42
4.4.1	Peroxidación de lípidos (TBARS)	42
4.4.2	Actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD)	44
4.4.3	Actividad de la enzima peroxidasa (POD)	46
4.4.4	Actividad de barrido de radicales libres (DPPH)	47
4.5	Relaciones entre parámetros químicos y bioquímicos del ensayo.	49
5	CONCLUSIONES	52
6	RESUMEN	53
7	SUMMARY	54
8	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1. INTRODUCCIÓN

El selenio (Se) es un micronutriente esencial para animales y humanos ya que forma parte de enzimas (iodotironina-deiodinasas (tipo I, II y III), tiorexodina reductasa), selenoproteínas (P, W) y enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa (GSH-Px). Además, son muchos los beneficios para la salud de humana y animal siendo los más importantes; el favorecer el sistema inmunológico, sistema cardiovascular, fertilidad, incidencia de células cancerígenas y contrarrestar la toxicidad de metales pesados como el mercurio y el arsénico.

La esencialidad del Se para las plantas aun no está demostrada, pero sí se observan respuestas benéficas a bajas concentraciones, tales como una mejora en el sistema antioxidativo, retraso en la senescencia y una mayor tolerancia al estrés por toxicidad de Al, entre otros. Por otra parte, a elevadas concentraciones, el Se puede generar toxicidad en las plantas, la cual depende de la especie y la concentración de Se presentando efectos competitivos o sinérgicos con nutrientes como el nitrógeno (N), fosforo (P) y azufre (S), los cuales afectan su disponibilidad en los suelos y su incorporación a la planta.

Existen diferentes formas químicas del Se; éstas están estrechamente relacionadas con las propiedades químicas y biológicas del suelo, presentando variaciones en sus estados de oxidación formando compuestos orgánicos e inorgánicos, los cuales varían en su disponibilidad para las plantas. Las formas de Se utilizadas en la fertilización de los suelos con Se son el selenito (Se^{+4}) y seleniato (Se^{+6}) ya que estas formas de Se son las más comunes bajo las condiciones químicas de los suelos. Ambas formas químicas de Se varían en su disponibilidad: mientras que selenito tiene una mayor afinidad por las superficies reactivas del suelo y se adsorbe a través de un

mecanismo de intercambio de ligandos, el seleniato presenta una unión de carácter electrostático con la superficie del suelo presentando una mayor lixiviación y movilidad.

En la Región de la Araucanía, las praderas y pasturas son el principal recurso forrajero para la producción de ganado, donde el género *Lolium* (ballica) es altamente utilizado por su amplia gama de cultivares los cuales aportan materia seca y nutrientes a la dieta. Los cultivares de ballica son fertilizados regularmente con compuestos minerales nitrogenados y azufrados, debido a que ambos nutrientes son esenciales para la nutrición, metabolismo y crecimiento de las plantas. Debido a la importancia que presenta la especie *Lolium perenne* L. como constituyente de pasturas perennes para pastoreo, ha surgido la necesidad de potenciar el sistema antioxidativo de las plantas a través de la fertilización con Se ya que los suelos presentes en la zona sur del país son deficientes en este micronutriente, pero aun no existen antecedentes sobre si la relación N-S-Se es benéfica o antagónica respecto a la absorción del Se por parte de las plantas.

Además, considerando que el ganado bovino presenta alteraciones en la salud debido a la deficiencia de Se en los suelos de la Región, la incorporación del Se a través del consumo de praderas fertilizadas con este micronutriente es una muy buena alternativa para incrementar su disponibilidad en la dieta del animal. En relación al modo de fertilización con Se, en este estudio se utilizó la tecnología de la peletización, adhiriendo el micronutriente a la semilla, debido a que el Se no se encuentra disponible como fertilizante en Chile para ser aplicado directamente a las praderas, por lo que la peletización de las semillas de *Lolium perenne* L. es una alternativa para incorporar el Se como fertilizante para que sea disponible para las plantas.

1.1 Hipótesis

La peletización de semillas de *Lolium perenne* L. con dosis crecientes de selenito aumentará la concentración de Se foliar del cultivar en estudio, incrementando su calidad nutritiva y capacidad antioxidante.

La concentración de Se foliar y el sistema antioxidativo de *Lolium perenne* L. se verán afectados por la fertilización con N, S y Se. Existirá una relación N-S-Se que maximizará la capacidad antioxidante de las plantas.

1.2 Objetivo general

Estudiar el efecto de la peletización de semillas con selenito sobre la acumulación de selenio y el sistema antioxidativo de *Lolium perenne* L. cv. Quartet bajo distintos niveles de fertilización de nitrógeno y azufre.

1.3 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la peletización de semillas con dosis crecientes de selenito sobre el rendimiento, concentración de selenito foliar y sistema antioxidante de *Lolium perenne* L. cv. Quartet.
- Estudiar la peroxidación lipídica y capacidad antioxidante en plantas de *Lolium perenne* L. cv. Quartet cultivadas en un Andisol bajo distintas dosis de fertilización con N, S y Se.
- Cuantificar la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y peroxidasa (POD) en hojas de plantas de *Lolium perenne* L. cv. Quartet cultivadas en un Andisol bajo distintos niveles de adición de N, S y Se.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Caracterización de la especie *Lolium perenne*

La especie *Lolium perenne* L., también conocida como ballica perenne, pertenece a la familia de las Poaceas, presenta una gran adaptabilidad a la zona sur de Chile, mayoritariamente entre las Regiones VIII a X donde es muy utilizada en el establecimiento pasturas para consumo animal debido a la gran gama de cultivares existentes y a su asociación con otras especies forrajeras. Se destaca entre las forrajeras por su alto potencial de producción de biomasa, buena fuente proteica y alto contenido de fibra localizado en su pared celular generando una alta digestibilidad y palatabilidad para los animales que la consumen (Teuber, 2000).

En relación a la calidad nutritiva de *Lolium perene*, en promedio la especie presenta niveles de digestibilidad de un 75%, 18 a 25% de proteína y un 2,5 % de energía metabolizable, lo que hace referencia a su gran establecimiento y producción para pastoreo animal y conservación de forraje en las Regiones IX y X. A su vez, los cultivares de ballica son establecidos en asociaciones con otras especies como *Festuca arundinacea* y *Dactylis glomerata* existiendo mezclas comerciales con proporciones definidas para cada especie y así potenciar el nivel nutritivo y proteico de la pastura (Demanet, 2007).

Los cultivares de ballica poseen una alta variabilidad genética, lo que genera su amplia distribución y adaptación en el mundo (Kubik et al., 2001); éstos se diferencian de acuerdo a su ciclo de vida en anuales, bianuales y perennes y de acuerdo a su genotipo en diploides (2n) y tetraploides (4n).

Los cultivares diploides presentan una mayor resistencia a las condiciones desfavorables como es el estrés hídrico, los ataques de plagas entre otros y presentan dentro de sus características la presencia de hojas finas un mayor número de macollos por planta (Demanet, 2008). Por su parte, los cultivares tetraploides aunque tienen un menor número de macollas, poseen un mayor contenido celular en sus hojas lo que confiere un aumento en la digestibilidad y aprovechamiento por parte del ganado (Hannaway et al., 1999). Estudios realizados por el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA) sobre nueve cultivares de ballica diploide y tetraploide establecidos para pastoreo de vacas lecheras, revelaron que las especies tetraploides fueron mayormente consumidas por el ganado lechero, teniendo además una mayor concentración de materia seca que los cultivares diploides (Opitz, 2002).

El cultivar seleccionado en este trabajo es Quartet que es de origen Neozelandés y creado por Wrightson. Es un cultivar tetraploide utilizado principalmente para pastoreo presenta alrededor de 285.979 semillas por kg^{-1} . Como características principales se destacan su floración tardía (28 días), hábito de crecimiento semi-erecto, hojas anchas de color verde oscuro y una alta cantidad de macollos, lo que produce una amplia cobertura y densidad del cultivo aumentando la productividad animal en los sistemas de pastoreo. Algunos cultivares comerciales tienen la presencia de hongo endófito en la semilla que proporciona una relación beneficiosa con el cultivo protegiéndolo del ataque de plagas como el gorgojo argentino barrenador del tallo (*Listronotus bonariensis*) durante todo el ciclo de vida del cultivar, aumentando su persistencia ante condiciones adversas de clima y suelo (Demanet, 2008).

Los cultivares tetraploides han sido estudiados en numerosos ensayos en términos de su rendimiento, calidad, productividad, preferencia y adaptabilidad a diversas zonas de la Región de la Araucanía, donde el cultivar Quartet es el más utilizado presentando una alta concentración de

materia seca y una mayor eficiencia en la utilización del pastoreo en comparación con cultivares diploides (Demanet, 2011).

2.2 Importancia del selenio como micronutriente

El selenio (Se) es un elemento cuya principal característica es la de encontrarse en los suelos en una concentración promedio de 0,2 a 0,3 mg kg⁻¹ (Fishbein, 1991; Dungan y Frankenberger, 1999). Uno de los beneficios más importantes del Se para la salud humana y animal es el rol antioxidante que ejerce en las células. Este fue identificado al ser el Se un co-factor de la enzima GSH-Px, la cual cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno en presencia de glutatión reducido, disminuyendo el estrés oxidativo y daño celular causado por especies reactivas de oxígeno (ROS) (Flohé et al., 1973).

El Se se clasifica como microelemento esencial para animales y humanos ayudando a combatir el estrés oxidativo, entre otras funciones. El rol que juega el Se en los animales es de suma importancia ya que su déficit genera una variedad de problemas en la salud de los animales como distrofia muscular, retención placentaria, entre otros (López et al., 1997). El uso del Se en la medicina humana como anticancerígeno ha sido motivo de estudio los últimos años. Por ejemplo, estudios de Menter et al. (2000) y Jiang et al (2001) en células cancerígenas de la próstata tratadas con selenito de sodio y selenometionina, postulan que la presencia de Se produciría una apoptosis o inhibición del crecimiento de las células cancerígenas de la próstata teniendo un efecto selectivo frente a las células prostáticas normales.

Son muchos los beneficios del Se en el crecimiento y metabolismo de las plantas los cuales han sido motivo de estudio para muchos investigadores (Cuadro 1). Estudios realizados por Singh et

al. (1980) en plantas de *Brassica juncea* L. demostraron que aplicaciones de $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ de seleniato estimulan el crecimiento y aumentan el rendimiento de materia seca. Por otra parte, aunque no existe evidencia molecular acerca de la esencialidad del Se para las plantas, la presencia de este elemento en la nutrición vegetal aumenta la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px) generando un aumento de la calidad y persistencia de las plantas al disminuir el estrés oxidativo. La concentración y formas del Se (selenito o seleniato) con la que se fertiliza la planta tiene una relación directa con su efecto antioxidante: dosis bajas de Se actúan como un antioxidante, inhibiendo la peroxidación de lípidos, mientras que a altas dosis el Se actúa como un pro-oxidante generando estrés oxidativo y disminución del rendimiento (Hartikainen et al., 2000; Cartes et al., 2005).

Además, existen numerosos antecedentes de que el Se posee un efecto benéfico en las plantas contra la toxicidad generada por altas concentraciones de metales. Experimentos con distintas dosis de cadmio (Cd) y Se en plantas, indicaron un estrés considerable en las plantas cultivadas sólo con Cd, mientras que en aquellas las cultivadas con Cd y Se, el Se disminuyó el efecto tóxico del Cd mejorando el sistema antioxidativo de las plantas (Munne-Bosch y Alegre, 2002; Munne-Bosch, 2005; Vorobets, 2006; Pedrero et al., 2008; Dom et al., 2010). Cartes et al. (2010) observaron que en plantas de ballica fertilizadas con Se bajo toxicidad por aluminio (Al), hubo una disminución en el estrés oxidativo y peroxidación de lípidos en plantas tratadas con bajas dosis de Se y un aumento en la actividad enzimática de la línea de defensa antioxidante. Resultados similares fueron descritos por Peng et al., (2002) y Qi et al., (2004) en las plantas tratadas con bajas dosis de Se en respuesta a un estrés oxidativo debido a altas dosis de fertilización con hierro (Fe).

Cuadro 1. Algunos de los benéficos estudiados por investigadores acerca del Se en las plantas.

Efecto del Se	Especie Vegetal	Referencia
Estimular el crecimiento y la acumulación de materia seca.	<i>Brassica juncea</i>	Singh et al. (1980)
Efecto beneficioso sobre el crecimiento.	<i>Medicago sativa</i>	Broyer et al. (1966)
	<i>Lactuca sativa</i>	Pennanen et al. (2002)
	<i>Camellia sinensis</i>	Hu et al. (2003)
Mejora el crecimiento y capacidad antioxidante.	<i>Lactuca sativa, Lolium perenne</i>	Hartikainen et al. (1997)
		Hartikainen y Xue (1999)
	<i>Glycine max</i>	Djanaguiraman et al. (2005)
Aumentar el crecimiento y calidad de los tubérculos.	<i>Solanum tuberosum</i>	Turakainen (2007)
Incrementar el crecimiento de las raíces.	<i>Lolium perenne</i>	Cartes et al. (2010)
Asimilación de nitrógeno.	<i>Hordeum distichon</i>	Aslam et al. (1990)
Aumenta el potencial respiratorio.	<i>Eruca sativa</i>	Germ y Osvald (2005)
Inducir la acumulación de almidón en los cloroplastos.	<i>Lactuca sativa</i>	Pennanen et al. (2002)
Estimular el crecimiento y la acumulación de materia seca.	<i>Glycine max</i>	Djanaguiraman et al. (2005)
Promueve la germinación.	<i>Momordica cochinchinensi</i>	Chen y Sung (2001)
Aumenta la capacidad antioxidante y retrasa la senescencia.	<i>Lactuca sativa, Lolium perenne</i>	Xue et al. (2001)
Regular el estado hídrico de las plantas.	<i>Triticum aestivum</i>	Kuznetsov et al. (2003)
Retrasa la muerte de las plantas por daño de radiación UV.	<i>Lactuca sativa</i>	Pennanen et al. (2002)
Promueve el crecimiento de las plantas sometidas a radiación UV-B.	<i>Lactuca sativa</i>	Hartikainen y Xue (1999)
Alivia el estrés oxidativo causado por la radiación UV.	<i>Lactuca sativa, Lolium perenne</i>	Hartikainen y Xue (1999)
		Hartikainen (2000)
	<i>Fragaria vesca</i>	Valkama et al. (2003)
	<i>Glycine max</i>	Djanaguiraman et al. (2005)
Aumenta la recuperación de las plantas del estrés lumínico y heladas.	<i>Solanum tuberosum</i>	Seppänen et al., (2003)
Mejora la tolerancia a la salinidad.	<i>Rumex acetosa</i>	Kong et al., (2005)
	<i>Cucumis sativus</i>	Hawrylak- Nowak (2009)
Mejora la utilización de la onda corta de la luz en la planta.	<i>Lactuca sativa</i>	Xue y Hartikainen (2005)
Mejora la tolerancia a las heladas.	<i>Cucumis sativus</i>	Hawrylak- Nowak et al., (2010)
	<i>Triticum aestivum</i>	Xu et al. (2010)
Protección contra el estrés oxidativo.	<i>Lolium perenne, Lactuca sativa, Glycine max</i>	Xue y Hartikainen (2000)
		Djanaguiraman et al. (2005)
Minimiza el efecto toxico y estrés oxidativo causado por la presencia de metales pesados.	<i>Oryza sativa.</i>	Cartes et al. (2005)
	<i>Brassica napus</i>	Qi et al. (2004), Peng et al. (2002)
	<i>Lolium perenne</i>	Filek et al. (2008)
		Cartes et al. (2010)

Adoptado de: Hasanuzzaman et al. (2010).

2.3 Formas de selenio en el sistema suelo-planta-animal

2.1.1 Comportamiento del Se en el suelo

El selenio se encuentra en la naturaleza de diferentes formas químicas siendo éstas selenuro, selenio elemental, selenito, seleniato y compuestos de selenio orgánico como selenio-proteínas y selenio-aminoácidos (Martens and Suarez, 1997), los cuales poseen una disponibilidad en el suelo dependiente del pH y aniones presentes en el suelo (Barrow, 1999; Cartes et al., 2005).

La afinidad del Se por las superficies minerales del suelo y su disponibilidad es dependiente de la forma química en que se encuentre presente (Barrow, 1999). De esta manera selenito y seleniato presentan distintos comportamientos en cuanto a su movilidad en el suelo. La adsorción del seleniato no presenta una modificación en la carga superficial del suelo, formando una unión de tipo electrostática con la superficie del suelo, mientras que la absorción del selenito se produce mediante la liberación de OH⁻ provenientes de los coloides del suelo a través de mecanismo de intercambio de ligandos (Neal et al., 1987).

Las Regiones IX y X poseen valores de Se en sus suelos de 0,02 a 0,18 mg kg⁻¹ (base de datos del Laboratorio de Análisis de Suelos y Plantas de la Universidad de La Frontera) siendo valores deficientes en praderas en relación a los requerimientos de los animales que las consumen. El selenito y el seleniato son las fuentes de Se mayormente encontradas en los suelos debido a que estas especies son más estables a condiciones de pH y potencial redox del suelo, mientras que el Se elemental y los selenuros sólo son estables a condiciones de suelo reductoras (Zhang y Sparks, 1990; su y Suárez, 2000). El mecanismo de adsorción de selenito es similar al del fosfato, por lo cual se puede generar una competencia en la adsorción entre ambos nutrientes, mientras, que el seleniato se comporta en el suelo de manera similar al sulfato (Neal et al., 1987).

2.3.2 Absorción, asimilación y translocación del Se en las plantas

La absorción y asimilación del Se por las plantas varía entre las especies vegetales e influyen también las condiciones ambientales, tipo de suelo, formas de fertilización y forma química del selenio (Werner Jaffé, 1992).

En relación a la capacidad de las plantas de acumular Se, Rosenfeld y Beath (1964) clasificaron las especies vegetales en tres categorías: (i) indicadoras de Se primario, las cuales poseen una capacidad de acumular varios miles de mg Se kg⁻¹ de materia seca, (ii) indicadoras de Se secundario capaces de absorber hasta 1000 mg Se kg⁻¹ y (iii) a las plantas no acumuladoras las cuales no absorben más de 100 mg Se kg⁻¹, perteneciendo a este grupo la especie *Lolium perenne* L. estudiada en esta Tesis.

La asimilación del Se en las plantas se realiza por la vía metabólica del azufre (S) ya que ambos elementos presentan características químicas similares. La absorción y traslocación del selenito y seleniato se desarrolla por mecanismos diferentes. El seleniato se adsorbe en forma activa a través de transportadores de sulfatos. Para el selenito se ha descrito que su absorción se realiza en forma pasiva (Brown and Shift, 1982) pero en estudios de Li et al. (2008) se postula que la adsorción de selenito es a través de un proceso de transporte activo en las plantas. Dentro de la planta el Se se transloca de las raíces al resto de la plantas y se acumula de diferentes formas, el seleniato se adsorbe y se acumula en la planta en forma de seleniato, mientras que el selenito se acumula en las plantas en formas orgánicas de Se (Kahakachchi et al. 2004).

2.3.3 Importancia del selenio en la salud animal

La mayor parte de la alimentación del ganado de la IX Región se basa en el pastoreo de praderas y el consumo de forrajes conservados, siendo un alto porcentaje deficientes en Se (Wittwer et al., 2002) lo que ha generado una necesidad de suplementar el micronutriente en la ración animal. Su consumo está definido por un rango de tolerancia muy estrecho, ya que concentraciones de 0,1 a 0,3 mg Se kg⁻¹ de materia seca son indicadas como apropiadas para el consumo por rumiantes (NRC, 2000) siendo de gran importancia respetar el rango de tolerancia de los animales para evitar problemas de salud por toxicidad (Stroud et al., 2010).

El Se es fundamental importancia en la salud animal como un componente de Se-proteínas las cuales desempeñan un papel importante en las funciones estructurales e inmunológicas (Pesutic et al., 2001) del animal. La deficiencia de Se en los animales provoca graves alteraciones en su salud, afectando el sistema inmune y reproductivo, lo que genera patologías como retención de placentaria, mastitis (Kruze et al., 2000), distrofia muscular y un incremento en la aparición de tumores (Wittwer et al., 2000). Las formas de superar el déficit de Se en el animal consiste en incorporar el elemento a la dieta alimenticia o a través de suministros orales o inyectables (Wittwer et al., 2002).

La forma de química del Se está directamente relacionada con la absorción de éste en el organismo del animal. Las formas inorgánicas de Se (selenito, seleniato) como sales minerales suministradas por vía oral poseen una menor eficiencia de absorción a nivel del yeyuno, mientras que las formas orgánicas (selenometionina, selenocisteína) son más eficientemente asimiladas en el metabolismo del rumiante (Segovia, 2005).

La asimilación del Se en rumiantes es alrededor del 29% en ovejas, 20% en bovinos. Esto se debe a que en el rumen el Se es reducido a una forma poco asimilable que al ingresar al abomaso produce una absorción limitada y finalmente ingresa al yeyuno donde es absorbido en mayor

proporción (Wright y Bell, 1996). La biodisponibilidad del Se en el intestino del animal varía según raza y estado biológico (Wittwer et al., 2002).

Los requerimientos de Selenio varían entre 3,6 a 7,2 mg día⁻¹ para el ganado bovino con un peso aproximado de 550 kg (Rogers y Gately, 1992; Hillman, 1994). Al disminuir el Se en el organismo del animal se produce una reducción en la actividad de la enzima glutatión peroxidasa aumentando la concentración de peróxidos e hidroperóxidos que afectan las estructuras celulares, las funciones inmunológicas y reproductivas del animal (Silva et al., 2000).

2.4 Absorción y asimilación del nitrógeno en las plantas

Una proporción importante de los compuestos orgánicos presentes en las células vegetales contienen nitrógeno (N), lo que hace referencia a su importancia a nivel metabólico en la formación de aminoácidos, fosfolípidos, clorofila, entre otros. Para que se produzca la asimilación de N, es necesario que se desarrolle una serie de reacciones bioquímicas algunas de las cuales requieren de energía en forma de ATP, lo que conlleva a un gran costo energético por parte de la planta (Salisbury and Ross, 2000).

Las plantas realizan dos procesos de incorporación de N, los cuales tienen lugar en las raíces pero varían de una especie a otra. Las especies de la familia de las leguminosas forman asociaciones simbióticas con bacterias capaces de fijar el N molecular (N₂), mientras que las demás especies vegetales absorben el N en forma de amonio y nitrato desde en el suelo (Taiz and Zeiguer, 2002).

Cuando las plantas absorben nitrato (Figura 1) la asimilación se inicia por un proceso de reducción del nitrato a nitrito en el citoplasma por la acción de la enzima nitrato reductasa (NR)

(Pereyra, 2001). Dado que el nitrito es un compuesto tóxico, las células vegetales lo transportan posteriormente desde el citoplasma a los cloroplastos de las hojas y a los plastidios de las raíces de la planta, y en cada organelo se produce la reducción del nitrito a amonio por acción de la enzima nitrito reductasa (NiR) (Barceló et al., 2001).

El amonio formado a través de esta reacción de reducción o bien el amonio absorbido directamente desde el suelo, es rápidamente incorporado a los esqueletos carbonados para la formación de glutamina que es el primer aminoácido en formarse. Posteriormente, se forman los aminoácidos restantes y las proteínas. El amonio al presentarse en abundancia en la planta genera la inhibición de la enzima nitrito reductasa para así evitar la toxicidad en la planta (Maldonado et al, 1991).

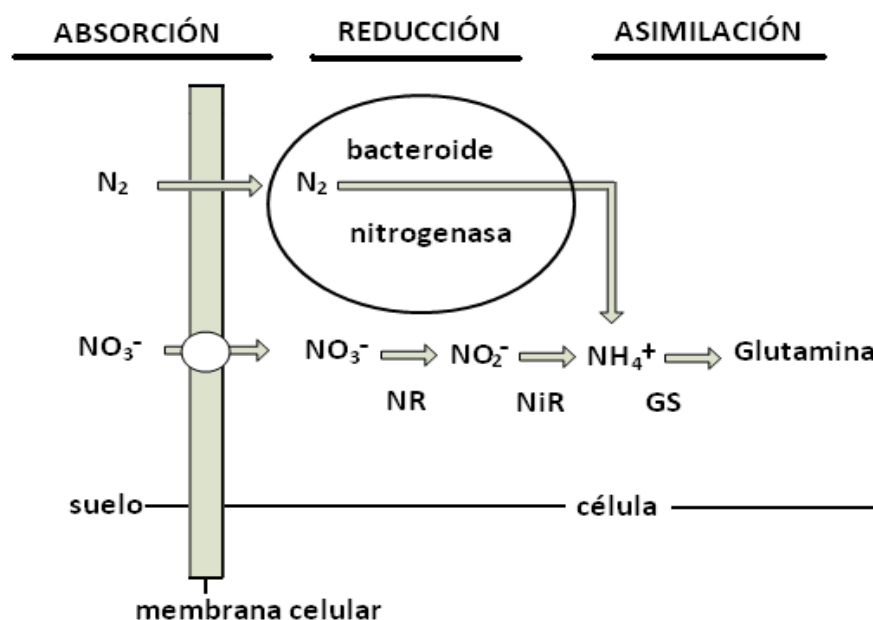


Figura 1. Proceso de fijación biológica del nitrógeno. NR, NiR y GS corresponden a las enzimas nitrato reductasa, nitrito reductasa y glutamina sintetasa respectivamente. Adoptado de: Marquez et al. (2004).

Al momento en que ocurre el proceso de asimilación del N los niveles de iluminación a los que se encuentra expuesta la planta juegan un rol significativo en la actividad de la enzima nitrato reductasa (NR). Así, estudios realizados en hojas de *Coffea arabica* L. revelan que las plantas expuestas a una mayor iluminación absorben más N y aumentan su producción de frutos en comparación a aquellas que recibieron menor iluminación durante el proceso enzimático. El contenido de humedad en el suelo produce una baja disponibilidad de agua para la planta generando una disminución en la síntesis enzimática producto de la disminución del flujo de nitrato hacia las hojas a través del xilema (Rodríguez et al. 2001).

2.5 Metabolismo del azufre en las plantas

El azufre (S) es un elemento esencial en el desarrollo de las plantas ya que éste forma parte de aminoácidos y proteínas en los tejidos vegetales. El S ingresa a la planta a través de dos vías: por el sistema radicular de la planta, pero también por las hojas, a través de las cuales el S ingresa como gas SO_2 , que se encuentra en la atmósfera y que es producido por procesos naturales de descomposición de la materia orgánica o por combustión (Salisbury and Ross, 2000).

La mayor parte del S absorbido por las raíces es de la forma de sulfato (SO_4^{-2}) el cual se incorpora al aminoácido cisteína en los tejidos fotosintéticos, ya que la reducción asimilativa del sulfato es un proceso que se lleva a cabo en los cloroplastos y es dependiente de luz (Benavides y Mendosa, 1998).

El proceso de asimilación del S (Figura 2) se inicia con la absorción del sulfato presente en el suelo, el cual es captado por las raíces de la planta y luego se transporta al interior de las células donde es reducido por medio de la enzima ATP sulfurilasa, dando como resultado la formación de adenosin 5-fosfosulfato (APS) que inicia la cadena de reacciones de la reducción del S teniendo lugar en dos vías. La primera tiene lugar en la mayoría de los organismos procariontes donde participan las enzimas APS quinasa, PAPS sulfotransferasa, sulfito transferasa y cisteína sintetasa para dar como producto cisteína, mientras que la segunda se desarrolla en algas y plantas producto de la participación de las enzimas APS sulfotransferasa, tiosulfonato reductasa y cisteína sintetasa produciendo cisteína. Parte de la cisteína producida se enlaza con otros péptidos y forman glutatión, un tripéptido que a través de la enzima metionina sintetasa, produce la metionina (Azcón et al., 2000).

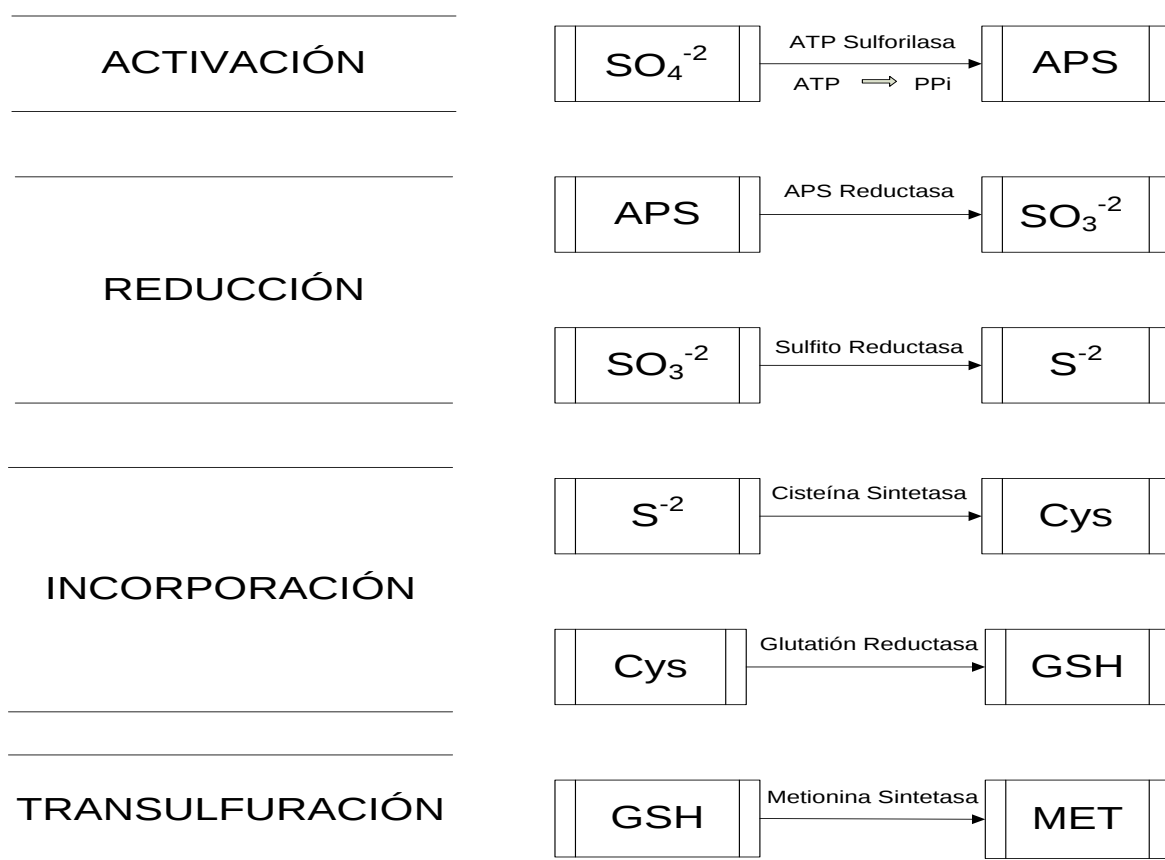


Figura 2. Proceso de asimilación del sulfato por las plantas. Adaptado de: Azcón et al. (2000).

La incorporación de S en los tejidos vegetales está estrecha relación con la incorporación de N. Cuando el S se encuentra en baja concentración en la planta se produce un déficit que genera trastornos fisiológicos, alterando el metabolismo y la síntesis de las proteínas y aminoácidos azufrados (Salisbury and Ross, 2000). Como consecuencia, la deficiencia de S en la planta genera un crecimiento lento, debilidad de las estructuras (hoja, tallo, raíz), clorosis y desarrollo incompleto de los frutos (Azcón et al., 2000). La forma de evitar la el déficit de S de la planta es a través de la fertilización azufrada de los suelos, para así alcanzar los niveles de suficiencia para su óptimo desarrollo y producción.

2.6 Interacción nitrógeno-selenio en las plantas

La interacción del N y el Se en las plantas ha sido poco estudiada pero la incidencia que posee la alta o baja concentración de estos elementos en la nutrición vegetal es muy relevante. Estudios realizados en *Lactuca sativa* L. confirman que la fertilización con elevadas dosis de selenito ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) en presencia de fertilización con $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y KNO_3 como fuentes de N puede ocasionar problemas de absorción y asimilación de N, ya que el Se inhibe la actividad de enzimas reductoras de nitrógeno como la nitrato reductasa (NR) ocasionando una baja incorporación del N a compuestos orgánicos de la planta. Por otra parte, la fertilización con dosis de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de selenito aumenta la actividad de las enzimas nitrato reductasa (NR), glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintetasa (GOGAT) como así también la concentración de N reducido en la planta (Rios et al., 2010).

La asimilación del Se y el N en la raíces de las plantas está regulado por varios factores en su mayoría enzimáticos, pero también por diferencia de gradiente, por efecto de la concentración de los fertilizantes y disponibilidad de agua en los suelos. En base a lo anterior, Feng et al. (2010) estudiaron los efectos del suministro de nitrato sobre la captación de selenito en raíces de plantas de arroz. Los resultados demostraron que a altas concentraciones de nitrato se produjo un bloqueo en la absorción de selenito por las raíces, al suministrarse ambos nutrientes en el mismo sitio de captación radical. A su vez el nitrato, facilitó más la absorción del selenito a bajas concentraciones en la solución nutritiva y la absorción también mostró diferencias con respecto a la zona radical en que se absorbieron los nutrientes.

Así, la forma química en que se suministre Se y N y su dosis de aplicación tienen una alta incidencia en la absorción de la planta y en el comportamiento de asimilación ambos nutrientes. Sin embargo, la información con respecto a la relación Se- N es escasa; de ahí deriva la importancia del estudio de esta relación en esta Tesis, para así contribuir a clarificar la información existente.

2.7 Interacción azufre-selenio en el sistema suelo-planta

Como fue anteriormente mencionado, el Se y el S poseen propiedades químicas similares. Por este motivo, el Se se asimila en los tejidos vegetales por medio de la vía metabólica del S, dando lugar a su incorporación en proteínas, aminoácidos y formas metiladas en lugar de S (Terry et al, 2000; Ellis y Salt, 2003).

La disponibilidad y adsorción de ambos nutrientes en el suelo depende del pH, potencial redox y la afinidad que tengan estos nutrientes por las superficies minerales del suelo (Balistreri y Chao, 1987; Neal et al., 1987).

Respecto a la relación del sulfato y seleniato en el suelo, estos aniones poseen similares mecanismos de adsorción, siendo el seleniato absorbido en las superficies del suelo electroestáticamente al igual que gran parte del sulfato presente, por lo cual existe una competencia por los sitios de adsorción de los minerales del suelo (Pardo et al., 1994). La relación selenito-sulfato ha sido poco estudiada, estudios sobre la absorción del selenito en presencia del sulfato en el suelo presentaron una disminución de la absorción del selenito disminuyendo su disponibilidad en el suelo (Pardo et al., 1994). Mientras, Goh y Lim, (2004) obtuvieron un resultado diferente donde la presencia de sulfato no generó una competencia con la adsorción de selenito lo que refleja que la relación selenito-sulfato aun no está del todo clara, en relación a la absorción competitiva entre ambos aniones en el suelo.

En las plantas el efecto negativo que ejerce el S en la absorción y metabolismo del Se ha sido motivo de diversos estudios la mayoría de ellas enfocadas a la interacción seleniato-sulfato (Terry et al., 2000). Cartes et al. (2006) al estudiar la influencia del sulfato sobre la absorción del selenito, obtuvieron resultados que están directamente asociados a la concentración de azufre presente en el suelo, debido a que la adición de dosis crecientes de fertilización azufrada disminuyó la absorción del selenito por parte de las plantas de *Lolium perenne*, generando además una disminución en la actividad de la enzima antioxidante glutatión peroxidasa (GSH-Px) y un aumento del estrés oxidativo en las plantas. Sin embargo, existen pocos estudios sobre la incidencia del S respecto a la actividad de enzimas antioxidantes en las plantas fertilizadas con selenito.

2.8 Selenio y estrés oxidativo de las plantas

El estrés oxidativo se produce debido a un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y la producción de antioxidantes encargados de contrarrestar el daño resultante por oxidación. El desbalance que se produce por reacciones redox en la célula puede causar efectos tóxicos por la producción de ROS que no son eliminadas ni transformadas a otros compuestos, los que pueden producir toxicidad en las células dañando su estructura y función (Avello, 2005).

La incorporación de Se en la planta ayuda al aumento de la capacidad antioxidante y la resistencia de la planta en respuesta a un estrés (Hartikainen y Xue, 1999). Estudios de Xue et al. (2001) sobre la capacidad del Se de disminuir el estrés en las plantas indicaron que la aplicación de seleniato a *Lactuca sativa* y *Glycine max* generó una mayor actividad de las enzimas antioxidantes, disminuyendo el daño oxidativo, en comparación a plantas que no fueron tratadas con seleniato.

La concentración y forma de Se que se suministre a la planta está en directa relación con la respuesta que se genere. Plantas de *Triticum aestivum* tratadas con bajas concentraciones de Se aumentaron su respuesta antioxidante, mientras que concentraciones altas de Se generaron una acción pro-oxidante (Nowak et al., 2004).

Estudios realizados en *Lolium perenne* han demostrado que la enzima GSH-Px en presencia de concentraciones bajas de seleniato (0,1 a 1,0 mg Se kg⁻¹) aumentó su actividad y disminuyó la peroxidación lipídica, mejorando la capacidad antioxidante de las plantas (Hartikainen et al., 2000), lo que coincide con estudios realizados por Cartes et al., (2005) donde la fuente de Se selenito fue más eficiente que el seleniato en inducir el aumento de la actividad GSH-Px.

2.9 Reacción de la peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica provoca daño celular al ocurrir la descomposición de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas biológicas, generando malonildialdehído y 4-hidroxiálqueno como productos finales de la reacción. La peroxidación lipídica es uno de los efectos más importantes de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en la célula, ya que la destrucción de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas provoca alteraciones significativas de la estructura de la membrana produciendo la pérdida de permeabilidad y posteriormente, la muerte celular.

La reacción de la peroxidación lipídica (Figura 3) se genera a través de la acción de ROS como el radical hidroxilo ($\text{OH}^\bullet$) que al combinarse con un hidrógeno del ácido graso poliinsaturado genera agua y un radical orgánico, el cual al no ser una molécula muy estable reacciona rápidamente con el oxígeno molecular presente en las células formando el radical peróxido ($\text{ROO}^\bullet$). Este a su vez reaccionará con otro ácido graso generando un lipídohidroperóxido cuyo producto de degradación puede ser malondialdehído, entre otros compuestos, generando una reacción en cadena (Cortes, 2009).

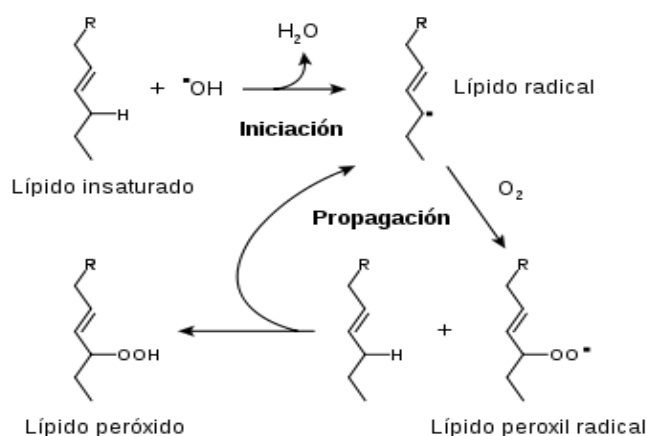


Figura 3. Reacción de la peroxidación lipídica. Adoptado de: Vickers et al. (2007).

2.10 Mecanismos de defensa antioxidantes

Las células poseen mecanismos enzimáticos y no enzimáticos para contrarrestar el estrés oxidativo así generar una protección a la membrana celular. La protección enzimática se lleva a cabo por medio de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) y peroxidasas (POD) que a través de reacciones eliminan los ROS en la célula. La SOD cataliza la dismutación del radical superóxido en peróxido de hidrógeno, el cual es reducido a agua a través de las enzimas antioxidantes tales como: glutatión peroxidasa (GSH-Px), ascorbato peroxidasa (APX) y catalasa (CAT) (Torres et al., 2006).

La protección no enzimática se lleva a cabo mediante compuestos presentes en las células tales como ácido ascórbico, tocoferol, glutatión y carotenoides (Figura 4). El ácido ascórbico se encuentra en numerosos tejidos de células vegetales y animales, actúa reduciendo las ROS y de esta forma disminuye los daños causados por el estrés oxidativo (Apel y Hirt, 2004). El tocoferol es un compuesto orgánico que los cuales actúa como antioxidantes protegiendo los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana celular y mitocondrial del daño oxidativo. El glutatión es un compuesto tripéptido que actúa reduciendo el peróxido de hidrógeno y también es utilizado como sustrato de enzimas. Los carotenoides son pigmentos presentes en diferentes estructuras de las plantas y organismos fotosintéticos, una de sus funciones es proteger a las células participando en la desintoxicación de los ROS producto del daño por radiación solar.

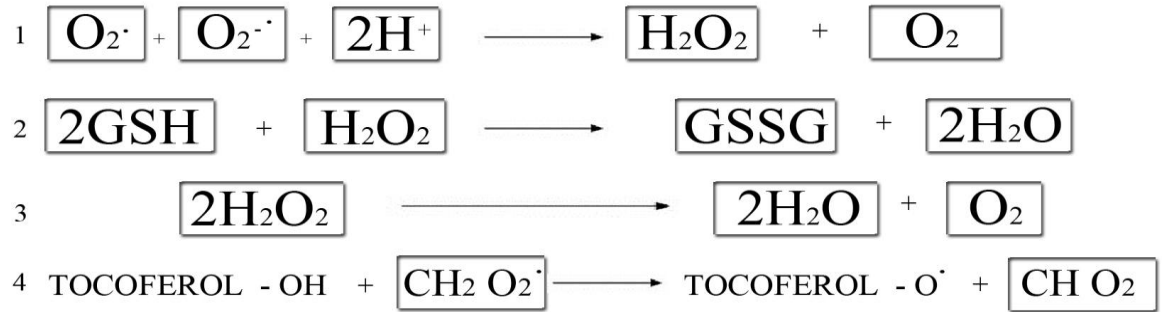


Figura 4. Reacción catalizada por la enzima superóxido dismutasa (1), glutatión peroxidasa (2) y catalasa (3), reacción del α - tocoferol (4). Adoptado de: Vickers et al. (2007).

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Características del suelo

El suelo utilizado para el establecimiento del ensayo corresponde a un Andisol perteneciente a la Serie Freire de la Región de la Araucanía, al cual se le realizó un análisis químico en el Laboratorio de Análisis de Suelo y Planta de la Universidad de la Frontera, Temuco.

Cuadro 2. Análisis químico de suelo inicial para ensayo de invernadero. Los valores representan el promedio de tres repeticiones $\pm$ desviación estándar.

Parámetro	Concentración		
Materia Orgánica (%)	18	$\pm$	1
P (mg kg ⁻¹)	20	$\pm$	1
S (mg kg ⁻¹)	12	$\pm$	1
pH (H ₂ O)	5,38	$\pm$	0,01
Ca (cmol + kg ⁻¹)	14,13	$\pm$	0,05
Mg (cmol + kg ⁻¹)	1,75	$\pm$	0,02
Na (cmol + kg ⁻¹)	0,09	$\pm$	0,02
K (cmol + kg ⁻¹)	0,90	$\pm$	0,02
Al (cmol + kg ⁻¹)	0,02	$\pm$	0,01
Suma de Bases (cmol + kg ⁻¹)	16,87	$\pm$	0,07
Saturación de Al (%)	0,12	$\pm$	0,01

3.2 Selección del cultivar en estudio

Para el ensayo se utilizó ballica perenne (*Lolium perenne* L.) la cual fue expuesta a diferentes tratamientos experimentales. El cultivar Quartet fue seleccionado de acuerdo a sus características fisiológicas y genéticas (tetraploide, 4n) considerando su utilización en el establecimiento de pasturas para la alimentación animal debido a su alto aporte nutricional.

3.3 Tratamientos

Los tratamientos utilizados para el establecimiento del cultivar Quartet consistieron en dos dosis de nitrógeno (N) (0 mg N kg^{-1} y 100 mg N kg^{-1}), tres dosis de azufre (S) (0 mg S kg^{-1} , 50 mg S kg^{-1} y 100 mg S kg^{-1}) y tres dosis de selenio (Se) (0 g Se ha^{-1} , 30 g Se ha^{-1} y 60 g Se ha^{-1}). Se generaron 18 tratamientos experimentales, con 3 repeticiones de cada uno, instalando un total de 54 macetas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Tratamientos experimentales utilizados para el ensayo.

TRATAMIENTO	N (mg N kg ⁻¹)	S (mg S kg ⁻¹)	Se (g Se ha ⁻¹)	REPETICIONES
0N-0S-0Se	0	0	0	R1 -R2- R3
0N-0S-30Se	0	0	30	R1 -R2- R3
0N-0S-60Se	0	0	60	R1 -R2- R3

0N-50S-0Se	0	50	0	R1 -R2- R3
0N-50S-30Se	0	50	30	R1 -R2- R3
0N-50S-60Se	0	50	60	R1 -R2- R3

0N-100S-0Se	0	100	0	R1 -R2- R3
0N-100S-30Se	0	100	30	R1 -R2- R3
0N-100S-60Se	0	100	60	R1 -R2- R3

TRATAMIENTO	N (mg N kg ⁻¹)	S (mg S kg ⁻¹)	Se (g Se ha ⁻¹)	REPETICIONES
100N-0S-0Se	100	0	0	R1 -R2- R3
100N-0S-30Se	100	0	30	R1 -R2- R3
100N-0S-60Se	100	0	60	R1 -R2- R3

100N-50S-0Se	100	50	0	R1 -R2- R3
100N-50S-30Se	100	50	30	R1 -R2- R3
100N-50S-60Se	100	50	60	R1 -R2- R3

100N-100S-0Se	100	100	0	R1 -R2- R3
100N-100S-30Se	100	100	30	R1 -R2- R3
100N-100S-60Se	100	100	60	R1 -R2- R3

3.4 Establecimiento del ensayo

El ensayo fue establecido en invernadero bajo condiciones controladas de riego y temperatura, las cuales fueron establecidas en un rango óptimo para la germinación de las semillas, emergencia de las plántulas y el desarrollo del cultivo en estudio.

Para el ensayo se utilizó el Andisol previamente caracterizado (Cuadro 2), el cual fue tamizado y previo a la siembra llevado a capacidad de campo (Figura 5). La siembra se realizó con 120 semillas de *Lolium perenne* L. cv. Quartet las cuales fueron sembradas en macetas que contenían 2,2 kg de suelo.

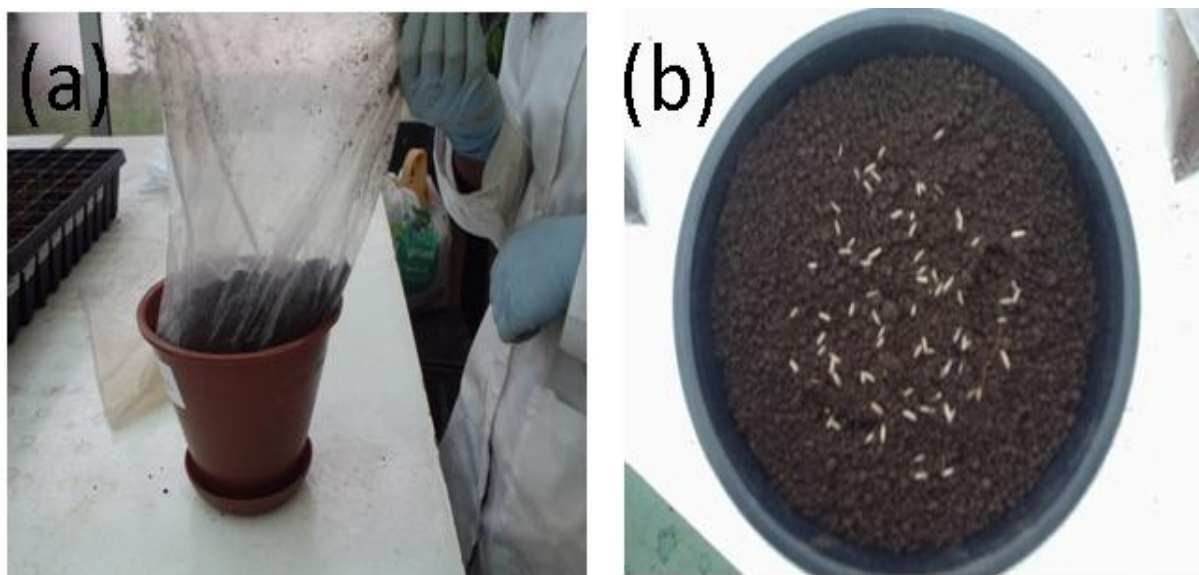


Figura 5. Preparación de suelo para capacidad de campo (a) y siembra de semillas de *Lolium perenne* L. cv. Quartet (b) en ensayo de invernadero.

3.5 Fertilización

La fertilización del ensayo fue dispuesta en tres formas de aplicación. Para el selenio (Se), se utilizó el método de peletización el cual será descrito en detalle en el siguiente ítem. En cuanto a la fertilización con fósforo (P) y azufre (S), éstos fueron incorporados en 770 g de suelo correspondientes al tercio superior de suelo de cada maceta. La dosis de P utilizada fue de 100 mg kg^{-1} de suelo para todas las macetas y el fertilizante utilizado fue Superfosfato triple. La fertilización de S se realizó con el producto Sulpomag, utilizando tres concentraciones: 0, 50 y 100 mg S kg^{-1} de suelo.

La fertilización con N se realizó a la emergencia de las plántulas, aplicándose dos tratamientos experimentales: 0 y 100 mg N kg⁻¹ de suelo en forma de una solución de urea. Para aquellas macetas que recibieron 100 mg N kg⁻¹ de suelo, la fertilización nitrogenada se parcializó en dos aplicaciones semanales de 50 mg S kg⁻¹ cada una, con la finalidad de evitar posibles riesgos de toxicidad a las plántulas.

3.6 Peletización

El proceso de fertilización con selenio (Se) fue llevado a cabo mediante el método de peletización propuesto por Mora et al. (2008) que consiste en embeber la semilla en una solución que contiene adhesivo, selenio y luego aplicarle una capa de dolomita (Magnecal) a modo de recubrimiento. El Se utilizado en la peletización fue en la forma química de selenito, utilizando como reactivo la sal Na₂SeO₃ x 5H₂O (MERCK p.a.) y los tratamientos experimentales consistieron en dosis equivalentes a aplicaciones de campo de 0, 30 y 60 g Se ha⁻¹ (Figura 6).

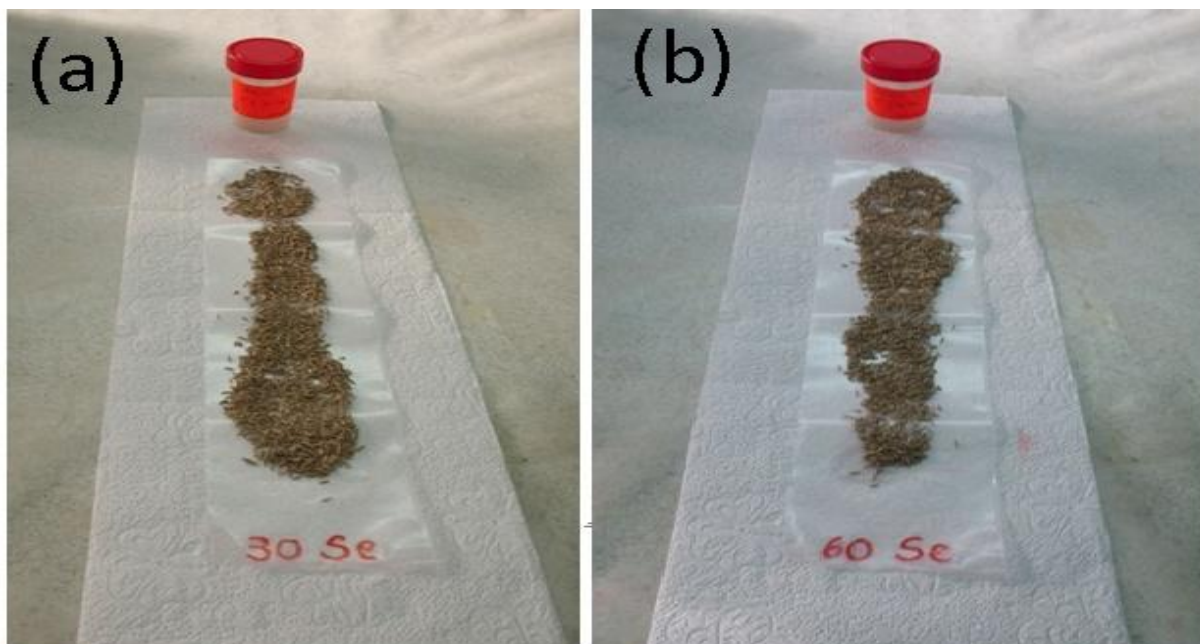


Figura 6. Peletización de semillas de *Lolium perenne* L. Quartet con dosis de 30 g Se ha⁻¹ (a) 60 g Se ha⁻¹ (b).

3.7 Cosecha

La cosecha se realizó cuando las plantas alcanzaron una altura de 30 cm (Figura 7). Al momento de la cosecha, se tomaron submuestras de materia verde las cuales fueron almacenadas en freezer a -20 °C y -70°C para realizar los análisis bioquímicos. Posteriormente, se realizó el corte total del material vegetal (Figura 8) y la biomasa fue colocada en un horno de ventilación forzada a 65°C por 48 horas para la obtención de materia seca y para análisis químico foliar.



Figura 7. Macetas de *Lolium perenne* L. cv. Quartet en desarrollo vegetativo en invernadero. Tratamiento 0N-100S-0Se (a) tratamiento 100N-0S-60Se (b).



Figura 8. Cosecha del ensayo (a) y macetas de *Lolium perenne* L. cv. Quartet posterior al corte del material vegetal (b).

3.8 Análisis químicos y bioquímicos

3.8.1 Análisis químico de suelo y foliar

Posterior al corte, el suelo correspondiente a cada maceta fue secado y tamizado a 2 mm para su posterior análisis de pH, P, S, bases de intercambio (Ca, Mg, K y Na) y aluminio de intercambio de acuerdo a la metodología descrita por Sadzawka et al. (2004a). Para el análisis foliar de N y S se utilizó la metodología descrita por Sadzawka et al. (2004b).

3.8.2 Análisis de selenio en tejidos vegetales

El análisis de concentración de Se de hojas se realizó mediante la metodología descrita por Kumpulainen et al. (1983). Las muestras se digirieron en una mezcla ácida (16 mL 65% HNO₃, 2 mL de 70% HClO₄ y 2 mL de 95% H₂SO₄) hasta alcanzar un volumen final de aproximadamente 3 mL. Al día siguiente, se realizó la reducción Se⁺⁶ a Se⁺⁴ utilizando HCl 12 % a una temperatura de 120°C durante 20 minutos. Se determinó la concentración de Se de las muestras por espectrofotometría de absorción atómica con generador de hidruros (EAA-GH).

3.8.3 Determinación de la peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica se midió a través del análisis de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) de acuerdo al método de Heath y Packer (1968) modificado por Du y Bramlage (1992). La absorbancia de las muestras se midió a tres longitudes diferentes de onda (532, 600 y 440 nm) con la finalidad de corregir las interferencias producidas por los complejos TBARS-polisacáridos. La concentración de TBARS se expresó en equivalentes de malondialdehído (nmol MDA mL⁻¹)

3.8.4 Determinación de las actividades de enzimas antioxidantes

La actividad de la enzima antioxidante superóxido dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1) se determinó a través de la reducción fotoquímica de nitroazul de tetrazolio (NBT). Una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima correspondiente a 50% de inhibición de la reducción de NBT (Donahue et al., 1997). La solución contenía 400 µL de fosfato de potasio tampón 0,1 µM pH 7,0, 10 µL de EDTA 10 mM, 50 µL de metionina 260 mM, 80 µL de NBT 4,2 mM, 170 µL de riboflavina 130 µM y 300 µL de sobrenadante. La absorbancia de las muestras se midió a 560 nm, previo a que las muestras con solución se iluminaron durante 15 minutos. Para cada reacción se utilizaron muestras no iluminadas como controles.

Para determinar la actividad de la enzima peroxidasa (POD; EC.1.11.1.7) se extrajo la enzima con una solución tampón de fosfato de potasio (50 mM) a pH 7,0. Las muestras fueron centrifugadas a 4°C durante 15 minutos. La actividad POD se determinó por la oxidación de los

tetraguaicol a 470 nm durante 60 segundos. La mezcla de reacción contenía 1 mL de tampón de extracción, 5 μL de H_2O_2 30%, 5 μL de guayacol y 3 μL del sobrenadante. El sobrenadante se utilizó como una extracto crudo de enzima. La actividad enzimática se calculó utilizando el coeficiente extinción molar de $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. La solución contenía 1 mL de buffer de extracción, 5 μL de H_2O_2 al 30%, 5 μL de guayacol y 2 μL de sobrenadante (Pinhero et al., 1997).

La actividad enzimática de la SOD y POD fue calculada en base a la concentración de proteína, determinada por el método de Bradford (1976).

3.8.5 Determinación de la capacidad antioxidante (DPPH)

La técnica DPPH es utilizada para medir la capacidad antioxidante de las plantas atribuida a compuestos antioxidantes. Se determinó midiendo la actividad de barrido del radicales libres, utilizando el radical 1,2 - difenil-2-picrilhidracilo (DPPH) según la metodología de Hatano et al. (1988) y descrita por Mora et al. (2008). La absorbancia de las muestras se midió a 520 nm y fue expresada como mg de Trolox g^{-1} peso verde en base a una curva estándar.

4.8.6 Análisis estadístico

Las variables en estudio fueron estadísticamente analizadas a través de un análisis de varianza (ANDEVA) y posteriormente la comparación de promedios se realizó a través de la prueba de diferencia mínima significativa (DMS) a un nivel de significancia de un 5%. Además, las relaciones entre dos variables respuestas fueron analizadas a través de la correlación de Pearson a un nivel de significancia de 5%.

4 PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Características químicas del suelo del ensayo

Se realizó un análisis químico del suelo utilizado en el ensayo en el Laboratorio de Análisis de Suelo y Planta de la Universidad de La Frontera, dando como resultado la composición química que se muestra en el Cuadro 2 en la sección 4.1. Al término del ensayo, se realizó un análisis químico de suelo final cuyos resultados se muestran en el Cuadro 4. Al finalizar el estudio, el promedio de pH (H₂O) de 5,8 encontrándose en los rangos de valores correspondientes a un suelo Andisol de la Región de La Araucanía.

La suma de bases alcanzó un valor en promedio de 17,52 cmol (+) kg⁻¹ donde el catión predominante fue el Ca con un valor promedio de 14,17 cmol (+) kg⁻¹ y la concentración de Al de intercambio presento un valor promedio de 0,037 cmol (+) kg⁻¹. Las concentraciones de S en el suelo presentaron variaciones en los tratamientos tratados con 50S y 100S lo que refleja el nivel de fertilización utilizado en estos tratamiento que genera una mayor disponibilidad de S en el suelo, los valores en promedio presentes en los tratamientos fueron los siguientes: 8,29 (0S) mg kg⁻¹, 26,04 (50S) mg kg⁻¹ y 45,10 (100S) mg kg⁻¹.

Cuadro 4. Análisis químico de suelo al final del estudio. Laboratorio de Suelo y Planta de la Universidad de La Frontera, Temuco 2010. Los valores presentados en el cuadro corresponden al promedio de tres repeticiones $\pm$ desviación estándar.

Tratamiento	pH	Al	P	S	Ca	Mg	Na	K	Suma de base	CICE	Saturación Al
	(H ₂ O)	(cmol(+)/kg)	mg/kg	mg/kg	(cmol(+)/kg)	(cmol(+)/kg)	(cmol(+)/kg)	(cmol(+)/kg)	(cmol(+)/kg)	(cmol(+)/kg)	(%)
0N 0S 0Se	5,79 $\pm$ 0,05	0,04 $\pm$ 0,02	26,46 $\pm$ 3	8,73 $\pm$ 1	14,18 $\pm$ 0,2	2,24 $\pm$ 0,1	0,17 $\pm$ 0,02	0,8 $\pm$ 0,14	17,38 $\pm$ 0,5	17,43 $\pm$ 0,4	0,26 $\pm$ 0,09
0N 0S 30Se	5,81 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,09	25,47 $\pm$ 1	8,86 $\pm$ 1	14,24 $\pm$ 0,1	2,23 $\pm$ 0,0	0,18 $\pm$ 0,01	0,89 $\pm$ 0,07	17,55 $\pm$ 0,2	17,65 $\pm$ 0,2	0,59 $\pm$ 0,49
0N 0S 60Se	5,80 $\pm$ 0,03	0,01 $\pm$ 0,00	29,07 $\pm$ 4	8,75 $\pm$ 1	14,17 $\pm$ 0,1	2,28 $\pm$ 0,1	0,17 $\pm$ 0,01	0,85 $\pm$ 0,13	17,48 $\pm$ 0,2	17,499 $\pm$ 0,2	0,11 $\pm$ 0,02
0N 50S 0Se	5,90 $\pm$ 0,04	0,01 $\pm$ 0,00	24,17 $\pm$ 1	26,93 $\pm$ 1	13,91 $\pm$ 0,4	2,14 $\pm$ 0,1	0,17 $\pm$ 0,01	0,93 $\pm$ 0,05	17,15 $\pm$ 0,5	17,16 $\pm$ 0,5	0,04 $\pm$ 0,02
0N 50S 30Se	5,92 $\pm$ 0,06	0,01 $\pm$ 0,00	24,26 $\pm$ 1	25,26 $\pm$ 4	14,32 $\pm$ 0,3	2,16 $\pm$ 0,1	0,18 $\pm$ 0,01	1,04 $\pm$ 0,11	17,69 $\pm$ 0,2	17,70 $\pm$ 0,3	0,03 $\pm$ 0,02
0N 50S 60Se	5,86 $\pm$ 0,03	0,01 $\pm$ 0,01	25,43 $\pm$ 1	28,08 $\pm$ 2	14,19 $\pm$ 0,5	2,20 $\pm$ 0,1	0,18 $\pm$ 0,04	1,00 $\pm$ 0,17	17,58 $\pm$ 0,7	17,59 $\pm$ 0,7	0,05 $\pm$ 0,04
0N 100S 0Se	5,98 $\pm$ 0,06	0,02 $\pm$ 0,00	23,50 $\pm$ 1	42,37 $\pm$ 3	14,08 $\pm$ 0,2	2,09 $\pm$ 0,0	0,16 $\pm$ 0,01	0,99 $\pm$ 0,03	17,33 $\pm$ 0,2	17,35 $\pm$ 0,2	0,11 $\pm$ 0,02
0N 100S 30Se	5,97 $\pm$ 0,06	0,02 $\pm$ 0,00	24,53 $\pm$ 3	49,07 $\pm$ 6	14,23 $\pm$ 0,1	2,17 $\pm$ 0,1	0,17 $\pm$ 0,01	1,04 $\pm$ 0,10	17,61 $\pm$ 0,1	17,62 $\pm$ 0,1	0,09 $\pm$ 0,00
0N 100S 60Se	5,93 $\pm$ 0,07	0,03 $\pm$ 0,00	24,62 $\pm$ 3	46,93 $\pm$ 4	14,16 $\pm$ 0,1	2,21 $\pm$ 0,1	0,18 $\pm$ 0,01	1,05 $\pm$ 0,05	17,61 $\pm$ 0,2	17,63 $\pm$ 0,3	0,16 $\pm$ 0,02
100N 0S 0Se	5,62 $\pm$ 0,00	0,03 $\pm$ 0,00	26,64 $\pm$ 3	7,51 $\pm$ 1	13,68 $\pm$ 0,7	2,24 $\pm$ 0,1	0,17 $\pm$ 0,02	1,09 $\pm$ 0,02	17,18 $\pm$ 0,8	17,21 $\pm$ 0,8	0,16 $\pm$ 0,03
100N 0S 30Se	5,67 $\pm$ 0,06	0,03 $\pm$ 0,00	25,12 $\pm$ 1	7,70 $\pm$ 1	14,51 $\pm$ 0,1	2,20 $\pm$ 0,0	0,18 $\pm$ 0,02	0,98 $\pm$ 0,19	17,88 $\pm$ 0,2	17,91 $\pm$ 0,2	0,18 $\pm$ 0,02
100N 0S 60Se	5,68 $\pm$ 0,04	0,04 $\pm$ 0,01	27,54 $\pm$ 3	8,18 $\pm$ 1	14,53 $\pm$ 0,9	2,28 $\pm$ 0,2	0,17 $\pm$ 0,01	0,79 $\pm$ 0,14	17,77 $\pm$ 1,1	17,82 $\pm$ 1,1	0,24 $\pm$ 0,03
100N 50S 0Se	5,69 $\pm$ 0,03	0,04 $\pm$ 0,00	24,35 $\pm$ 1	27,85 $\pm$ 4	13,96 $\pm$ 0,5	2,11 $\pm$ 0,1	0,17 $\pm$ 0,01	0,75 $\pm$ 0,15	17,00 $\pm$ 0,7	17,04 $\pm$ 0,7	0,24 $\pm$ 0,01
100N 50S 30Se	5,70 $\pm$ 0,03	0,05 $\pm$ 0,01	25,07 $\pm$ 3	25,42 $\pm$ 7	14,39 $\pm$ 0,0	2,22 $\pm$ 0,1	0,16 $\pm$ 0,03	0,80 $\pm$ 0,07	17,58 $\pm$ 0,1	17,63 $\pm$ 0,1	0,27 $\pm$ 0,04
100N 50S 60Se	5,72 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,02	24,17 $\pm$ 1	22,66 $\pm$ 2	13,98 $\pm$ 0,6	2,13 $\pm$ 0,1	0,18 $\pm$ 0,02	0,85 $\pm$ 0,10	17,14 $\pm$ 0,8	17,21 $\pm$ 0,7	0,41 $\pm$ 0,12
100N 100S 0Se	5,77 $\pm$ 0,03	0,08 $\pm$ 0,01	23,99 $\pm$ 1	41,84 $\pm$ 5	14,05 $\pm$ 0,2	2,37 $\pm$ 0,3	0,18 $\pm$ 0,01	0,85 $\pm$ 0,15	17,46 $\pm$ 0,4	17,53 $\pm$ 0,4	0,43 $\pm$ 0,08
100N 100S 30Se	5,75 $\pm$ 0,03	0,03 $\pm$ 0,00	25,88 $\pm$ 2	48,87 $\pm$ 5	14,14 $\pm$ 0,3	2,21 $\pm$ 1,1	0,22 $\pm$ 0,02	0,97 $\pm$ 0,05	17,54 $\pm$ 0,9	17,56 $\pm$ 0,9	0,16 $\pm$ 0,01
100N 100S 60Se	5,75 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,00	24,44 $\pm$ 1	41,51 $\pm$ 3	14,39 $\pm$ 0,1	2,83 $\pm$ 0,1	0,22 $\pm$ 0,01	1,00 $\pm$ 0,10	18,44 $\pm$ 0,2	18,47 $\pm$ 0,2	0,17 $\pm$ 0,02

4.2 Efecto de la relación N-S-Se sobre la producción de materia seca.

Se ha demostrado que la dosis de aplicación de Se tiene una influencia sobre la absorción de Se y producción de materia seca (ms). En este contexto, Simojoki et al. (2003) observó que concentraciones de Se sobre los 20 mg kg⁻¹ ms en plantas de *Lactuca sativa* generaron una disminución los rendimientos de materia seca además de afectar la morfología de las raíces. Igualmente un estudio de Cartes et al., (2005) se observó que altas dosis de Se en plantas de ballica disminuyeron el rendimiento de materia seca, mientras que a dosis bajas no se presentó ninguna diferencia en el rendimiento del cultivar Quartet. Por otra parte, concentraciones bajas de Se promovieron la producción de materia seca en las especies *Brassica juncea* L. (Singh et al., 1980), *Lolium perenne* L. (Hartikainen y Xue, 1999), *Glycine max* L. (Djanaquiraman et al., 2005), *Lycopersicon esculentum* (Becvort et al. 2011) y *Solanum tuberosum* (Turakainen et al., 2004).

La materia seca foliar (Figura 9) obtenida para cada tratamiento no presentó diferencias significativas por la aplicación de las dosis crecientes de fertilización con N, S y Se en comparación al tratamiento control (0N-0S-0Se). No hubo efecto, como era de esperarse, dado que los niveles de aplicación de Se fueron bajos, pues se seleccionaron de un estudio previo en base a los requerimientos nutricionales del ganado. En dicho Cartes et al. (2011) demostraron que al aumentar la dosis de aplicación de Se hasta 60 g ha⁻¹, no afectó el rendimiento de hojas ni de las raíces de tres cultivares de ballica. Por otra parte, estudios de Hopper y Parker (1999) demuestran que el selenito se transloca muy poco al follaje de las plantas, y que podría ser metabolizado a Se orgánico en las raíces y acumulándose en éstas (Simojoki 2003), por lo que no presentaría una interferencia en el desarrollo foliar de las plantas.

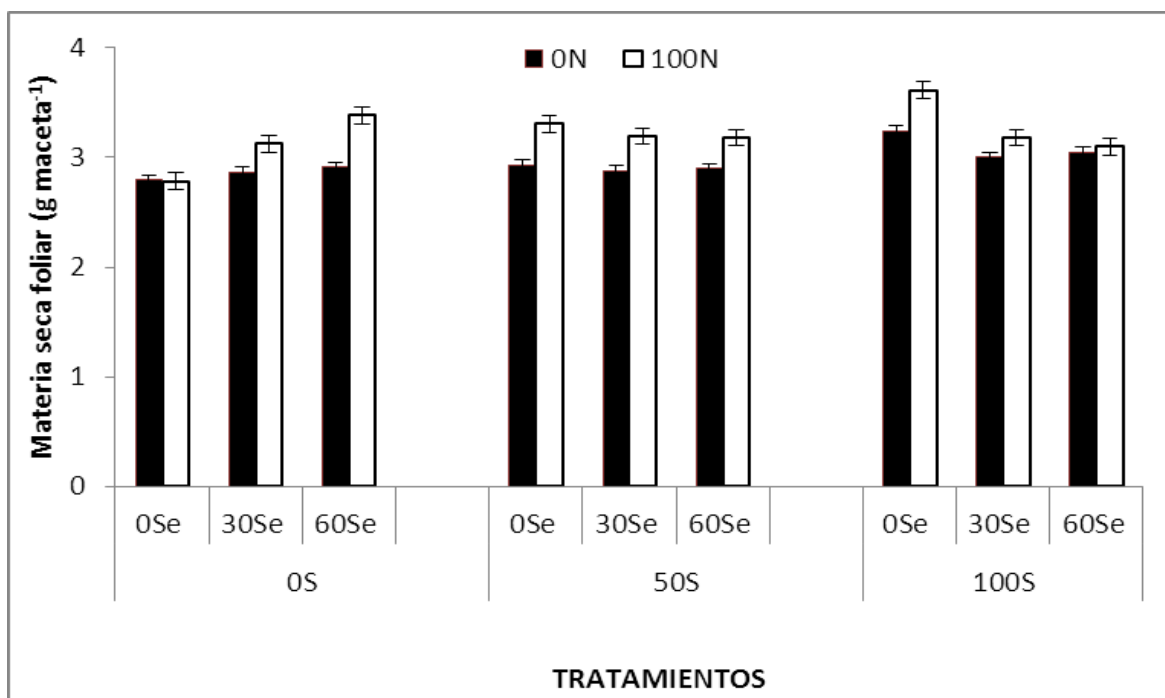


Figura 9. Producción de materia seca foliar de *Lolium perenne* cv. Quartet a dosis crecientes de aplicación de nitrógeno, azufre y selenio. Los valores representan el promedio de tres repeticiones por cada tratamiento $\pm$ desviación estándar.

4.3 Determinación de las concentraciones de selenio, azufre y nitrógeno foliar

La concentración de Se foliar de *Lolium perenne* se incrementó progresivamente a dosis crecientes de aplicación de Se hasta 60g Se ha⁻¹. La concentración de Se foliar más alta fue de $1128,7 \pm 37,9 \mu\text{g kg}^{-1}$ ms, en el tratamiento 0N-0S-60Se, mientras que la más baja fue de 8,52

$\pm 0,16 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ ms}$, en el tratamiento 100N-100S-0Se, lo que demuestra que el selenito peletizado a la semilla es incorporado a la planta y translocado al follaje (Figura 10).

Por otra parte, la concentración de Se foliar varió entre los tratamientos fertilizados con N (100 mg N kg^{-1} de suelo) y los que no fueron fertilizados con N. El valor promedio más alto de la concentración de Se ($1128,7 \pm 37,9 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ ms}$) fue en el tratamiento sin N (0N-0S-60Se), mientras que el tratamiento fertilizado con N (100N-0S-60Se) la concentración de Se disminuyó en un 17 % ($932,17 \pm 134,5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ ms}$) lo que reflejaría que el N podría estar limitando la incorporación de Se a la planta de *Lolium perenne*, lo que coincide con los resultados obtenidos por Ríos et al. (2010) en *Lactuca sativa*, Feng et al. (2010) y Xu et al. (2010) en plantas de *Oryza sativa* donde en ambos ensayos la adición de N en los tratamientos fertilizados con Se generó una disminución de la concentración de Se foliar en comparación a los tratamientos que no fueron fertilizados con N. La acción acidificante de la urea utilizada como fuente de N en el ensayo, podría ser una causa de la disminución de la absorción de Se, debido al cambio de pH del suelo.

Además, la concentración de Se foliar se vio afectada por la fertilización con dosis de 50 y 100 mg S kg^{-1} suelo en comparación a los tratamientos sin fertilización con S. Las plantas que no recibieron fertilización nitrogenada y que fueron tratadas con 60 g Se ha^{-1} disminuyeron su concentración de Se foliar en un 15,2 % y 17 % bajo la aplicación de 50 y 100 mg S kg^{-1} suelo, respecto a los tratamientos testigos (0N-0S-0Se), lo que coincide con estudios previos que indican la incidencia del S en la disminución de la absorción y/o incorporación de selenito en las plantas (Asher et al., 1977; Zayed et al., 1998; Cartes et al., 2006). Los tratamientos que recibieron fertilización nitrogenada y dosis de 30 y 60 g Se ha^{-1} , disminuyeron su concentración de Se foliar bajo la aplicación de $50 \text{ mg de S kg}^{-1}$ suelo en un 20% y 24% respectivamente, mientras que las plantas que recibieron $100 \text{ mg de S kg}^{-1}$ a dosis de 30 y 60 g Se ha^{-1} , disminuyeron su concentración de Se foliar en un 16 % y 20 %, lo que denota que la fertilización nitrogenada generó un efecto negativo en la absorción de selenito.

Con respecto a la concentración de S foliar, las plantas que no fueron fertilizadas (0N-0S-0Se) presentaron una concentración promedio de $2,21 \pm 0,23 \text{ g S kg}^{-1}$ materia seca. En la Figura 11

se observa un incremento en la concentración de S foliar en los tratamientos que fueron fertilizados con S en dosis de 100 mg S kg⁻¹ materia seca y 0 ó 30 g Se ha⁻¹, presentando la concentración foliar más alta de S (3,16 g kg⁻¹ materia seca) el tratamiento fertilizado sólo con 100 mg S kg⁻¹ de suelo (0N-100S-0Se). Al aumentar la dosis de Se en los tratamientos con 100S y 0N, se observa una tendencia a disminuir la concentración foliar de S lo cual se podría atribuir una competencia entre selenito y sulfato en los procesos de absorción o asimilación de ambos nutrientes en los tejidos vegetales (Terry et al., 2000; Zayed et al., 1998; Cartes et al., 2006) Las concentraciones de S foliar de los demás tratamientos experimentales no generaron diferencias significativas sobre la concentración de S foliar de *Lolium perenne*.

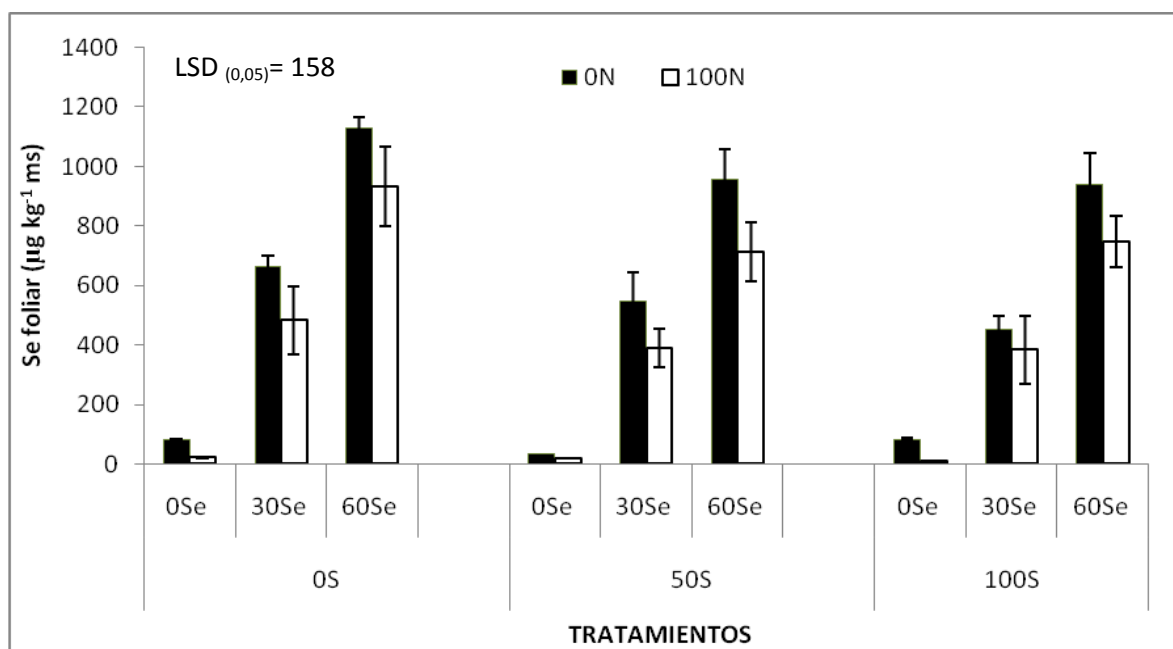


Figura 11. Concentración de Se foliar de *Lolium perenne* cv. Quartet a dosis crecientes de aplicación de nitrógeno, azufre y selenio. Los valores representan el promedio de tres repeticiones por cada tratamiento $\pm$ desviación estándar.

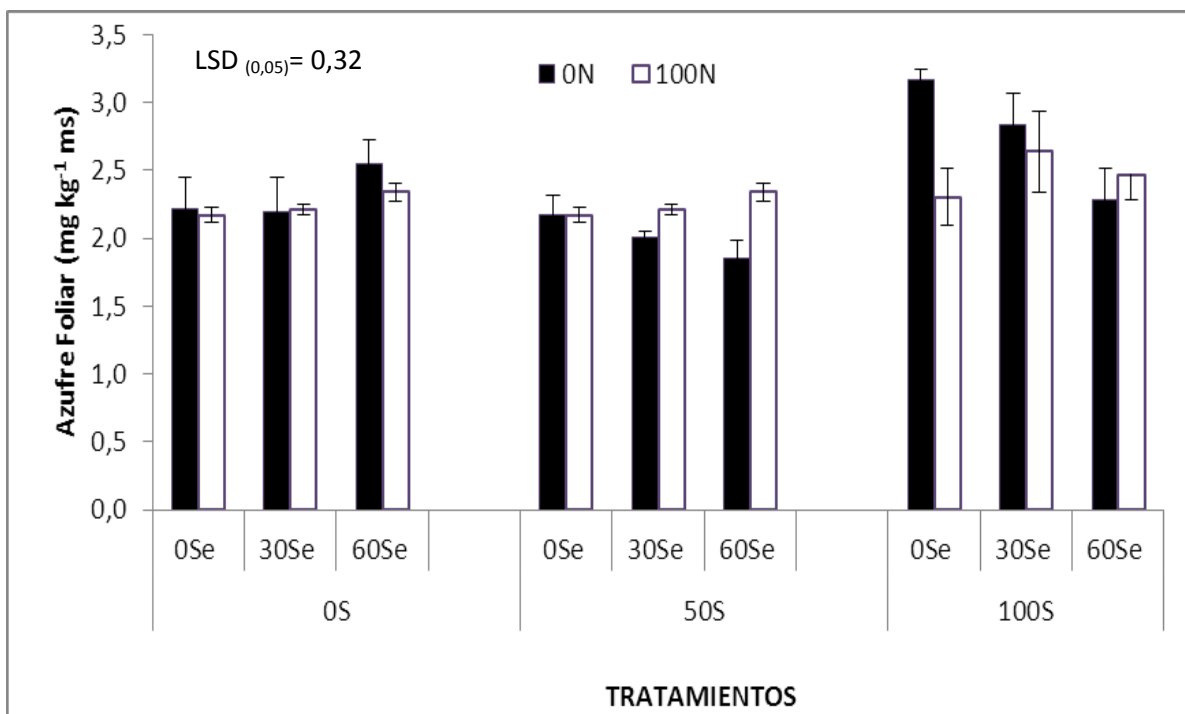


Figura 12. Concentración de S foliar de *Lolium perenne* cv. Quartet a dosis crecientes de aplicación de nitrógeno, azufre y selenio. Los valores representan el promedio de tres repeticiones por cada tratamiento $\pm$ desviación estándar.

Por otra parte, la concentración del N foliar de los tratamientos no se vio afectada con los distintos niveles de fertilización con S y Se. Sin embargo, la aplicación de N aumentó significativamente la concentración de N foliar. El valor promedio de N foliar fue de $44,7 \pm 2,9 \text{ g kg}^{-1} \text{ ms}$, en los tratamientos sin aplicación de N (0N) y en los tratamientos con N (100N) fue de $52,6 \pm 1,2 \text{ g kg}^{-1} \text{ ms}$.

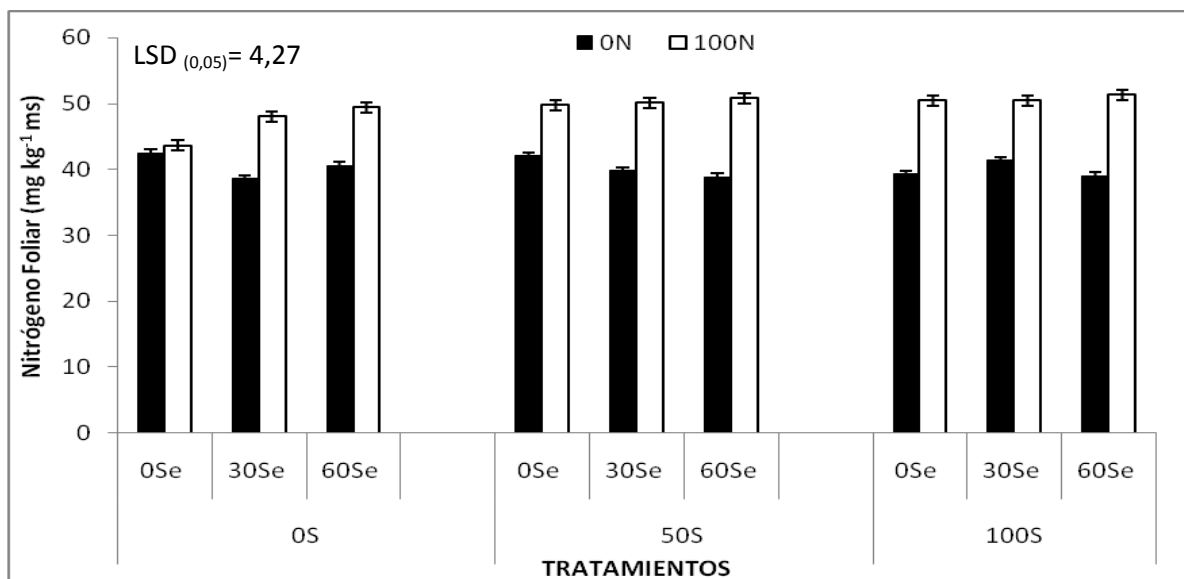


Figura 13. Concentración de N foliar de *Lolium perenne* cv. Quartet a dosis crecientes de aplicación de nitrógeno, azufre y selenio. Los valores representan el promedio de tres repeticiones por cada tratamiento $\pm$ desviación estándar.

4.4 Efecto de la interacción N-S-Se sobre la actividad antioxidante en *Lolium perenne*.

4.4.1 Peroxidación de lípidos (TBARS)

La peroxidación de lípidos es un indicador de estrés oxidativo sufrido en las membranas celulares de las plantas. En la Figura 14, se muestran los valores obtenidos de acumulación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en cada tratamiento en relación a los

diferentes tratamientos experimentales. Los valores más altos de peroxidación de lípidos se observaron en el tratamiento control (0N-0S-0Se) y en el tratamiento 0N-100S-60Se, mientras que en el tratamiento 100N-50S-60Se se registró la más baja acumulación de TBARS, disminuyendo un 53% con respecto al tratamiento testigo lo que refleja una disminución del daño oxidativo de la planta. Esto concuerda con diversos estudios realizados en diferentes especies vegetales, que indican que la adición de bajas dosis de Se disminuyen la peroxidación lipídica y con ello el estrés oxidativo, por lo cual podemos concluir el efecto protector que presenta el Se en el sistema antioxidativo de las plantas (Xue y Hartikainen, 2000; Djanaquiraman et al., 2005; Cartes et al., 2005). Los tratamientos sin fertilización nitrogenada y fertilizados con 100 mg S kg⁻¹, aumentaron la acumulación de TBARS a dosis crecientes de Se (0-30-60 g Se ha⁻¹) lo que generó un mayor estrés en las plantas.

Asimismo, las plantas fertilizadas con N presentaron una tendencia a disminuir la peroxidación de lípidos a dosis crecientes de Se, lo que indica que la relación N-Se es favorable para el sistema antioxidativo lo que concuerda con lo descrito por Pennanen et al. (2002) donde se produce una disminución significativa en la peroxidación lipídica al aplicar selenio en presencia de fertilización con N en plantas de *Lactuca sativa* que fueron expuestas a radiación UV-B y UV-C.

La incorporación de selenito como fertilizante en las plantas favoreció el sistema antioxidativo ya que actuó como antioxidante disminuyendo la peroxidación de lípidos de membrana, como se ha estudiado anteriormente en plantas de *Lolium perenne* (Cartes et al., 2011). La aplicación de bajas concentraciones de Se incrementa la capacidad antioxidante de las plantas, lo que se refleja en la concentración de TBARS que disminuye en los tratamientos con Se, demostrando que la aplicación de Se produce un efecto benéfico en el sistema antioxidante de las plantas (Hartikainen et al., 2000 ; Chen y Sung, 2001 ; Cartes et al., 2005 ; Cartes et al., 2010).

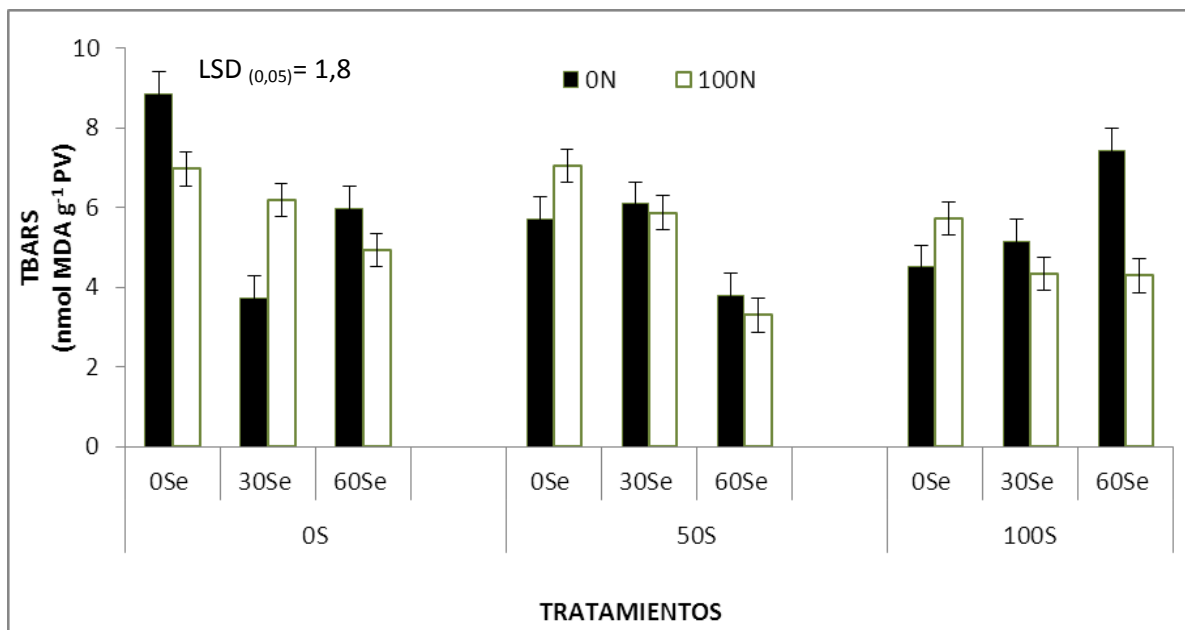


Figura 14. Peroxidación de lípidos en hojas de *Lolium perenne* cv. Quartet a dosis crecientes de aplicación de nitrógeno, azufre y selenio. Los valores representan el promedio de tres repeticiones por cada tratamiento $\pm$ desviación estándar.

4.4.2 Actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD)

Se ha demostrado que la incorporación de selenito aumenta significativamente la respuesta antioxidante de la planta (Gratao et al., 2005). En este estudio, para la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) hubo una interacción entre los tres factores en estudio (N-S-Se). La figura 15 muestra que la enzima superóxido dismutasa incrementó su actividad significativamente ($p \leq 0,05$) por la aplicación de Se en dosis de 60 g Se ha⁻¹ en los tratamientos 0N-0S y 0N-100S, lo que concuerda con estudios realizados en *Lactuca sativa* por Xue et al. (2001) donde la aplicación de Se aumentó la actividad de la enzima SOD y la

capacidad antioxidante de la planta, con los estudios de Sreekala et al. (1999) donde se observó que la actividad de la SOD aumentó progresivamente en base a la dosis de Se aplicado.

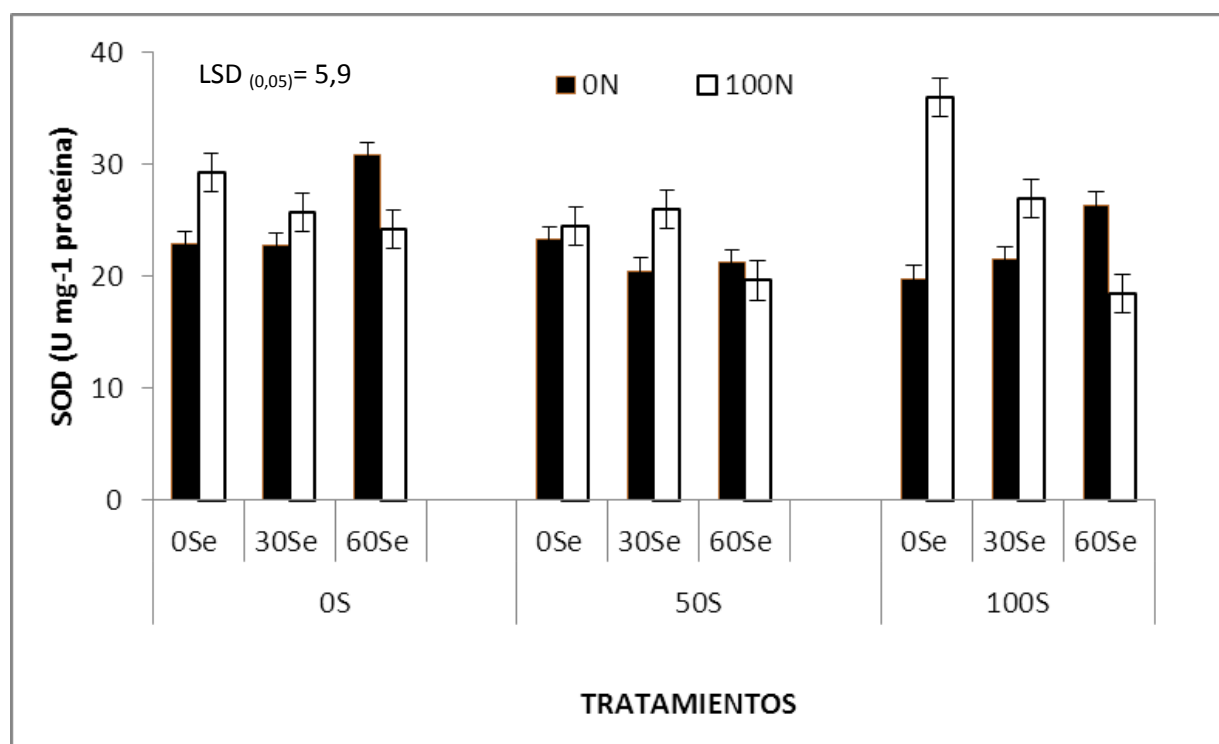


Figura 15. Actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en plantas de *Lolium perenne* cv. Quartet a dosis crecientes de aplicación de nitrógeno, azufre y selenio. Los valores representan el promedio de tres repeticiones por cada tratamiento $\pm$ desviación estándar.

La actividad más alta de la SOD fue observada en el tratamiento 100N-100S-0Se con un valor de $36,04 \pm 4,3$ disminuyendo en un 25 % y 49 % en respuesta de la adición de 30 y 60 g ha^{-1} respectivamente. Estos resultados se pueden atribuir a la hipótesis de que a dosis apropiadas, el Se reduce la necesidad de la enzima SOD disminuyendo la concentración de aniones superóxido a través de la dismutación espontánea de éstos en presencia de Se (Hartikainen et

al., 2000; Cartes et al., 2010). Así mismo, en las plantas que fueron fertilizadas con 100 mg N kg⁻¹ y 50 mg S kg⁻¹ suelo, la actividad de la enzima decreció en 20 % al aumentar la dosis de Se aplicada. Estos resultados coinciden con una reducción significativa del daño oxidativo en comparación a los valores de peroxidación obtenidos para las plantas correspondientes al tratamiento 0N-100S-60Se (Figura 14).

4.4.3 Actividad de la enzima peroxidasa (POD)

La actividad de la enzima POD en los diferentes tratamientos fue significativamente afectada por las variables en estudio (N-S-Se; $p \leq 0,05$). El valor más alto de actividad POD se registró en las plantas que no recibieron N y que fueron fertilizadas con 50 ó 100 mg S kg⁻¹ suelo y 60 g Se ha⁻¹ alcanzando una actividad promedio de $1,94 \pm 0,33 \mu\text{mol mg}^{-1} \text{ proteína minuto}^{-1}$ (Figura 16), lo que confirma que la incorporación de Se en la planta genera una mayor actividad de enzima POD en especies como *Triticum aestivum* (Nowak et al. 2004), *Glycine max* (Djanaguiraman et al. 2005) y *Coffea arabica* (Gomes et al. 2007).

No obstante, considerando los resultados de peroxidación lipídica se puede especular que la activación de la enzima POD en el tratamiento 0N-100S-60Se podría estar relacionado con alguna posible alteración del metabolismo nutricional del N en las plantas debido a que la ausencia de fertilización nitrogenada podría estar limitando algunas funciones metabólicas de las plantas induciendo un estrés a través de la formación de peróxidos de hidrógenos que podrían incidiendo en la mayor actividad POD.

A su vez, la actividad POD disminuyó por efecto de la aplicación de 100 mg N kg⁻¹ ms, debido posiblemente a la disminución de la concentración de Se foliar.

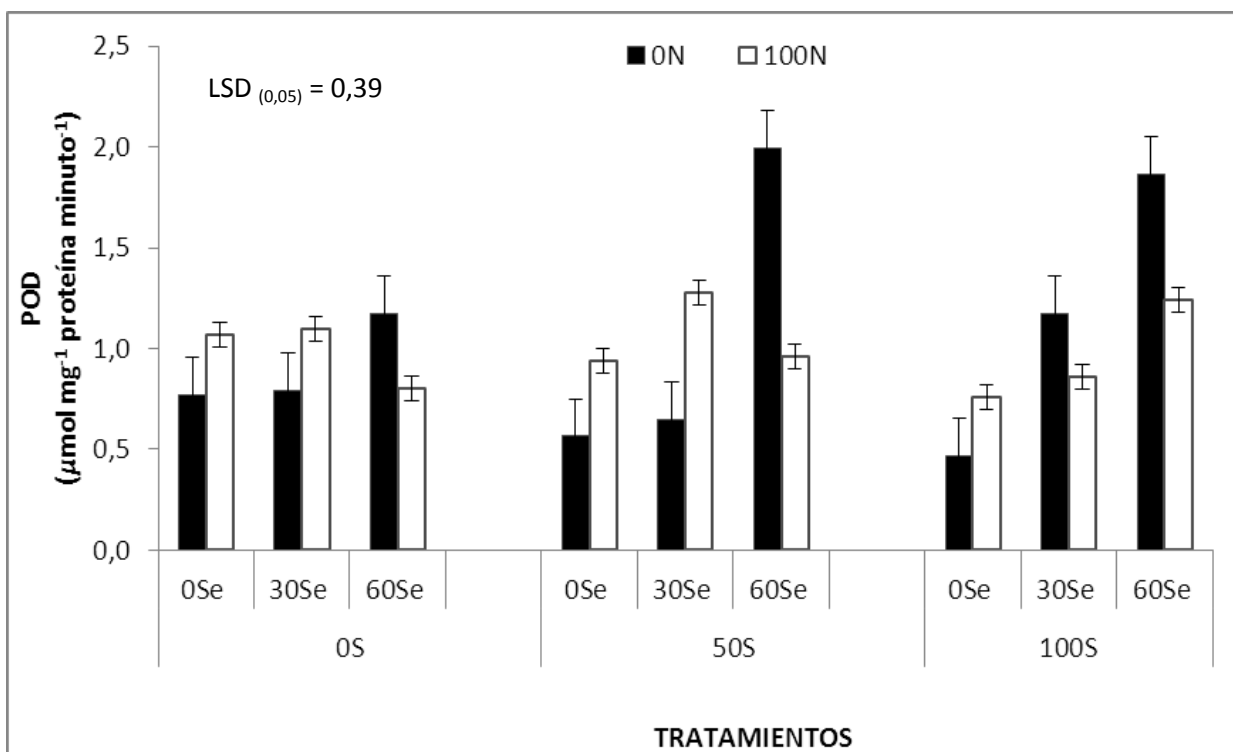


Figura 16. Actividad de las peroxidasa (POD) en plantas de *Lolium perenne* cv. Quartet a dosis crecientes de aplicación de nitrógeno, azufre y selenio. Los valores representan el promedio de tres repeticiones por cada tratamiento $\pm$ desviación estándar.

4.4.4 Actividad de barrido de radicales libres (DPPH)

Los resultados indican que hubo un efecto significativo de los tratamientos experimentales sobre la actividad de barrido de radicales libres (DPPH) que corresponde a la actividad antioxidante atribuida a compuestos antioxidantes. La Figura 17 indica que el valor más alto

se presentó en el tratamiento correspondiente a la aplicación de 60 g Se ha⁻¹, 100 mg N kg⁻¹ y sin fertilización (0N-0S-60Se), demostrando un efecto benéfico del Se en la capacidad de compuestos antioxidantes para desintoxicar las especies reactivas de oxígeno (ROS). En la Figura 17 además, podemos observar que cuando las plantas fueron fertilizadas con 100 mg S kg⁻¹ la capacidad antioxidante aumento en al menos un 40% en las plantas tratadas con 100 mg N kg⁻¹ suelo, independientemente de la dosis de Se aplicada.

Por otra parte, para las plantas que no recibieron fertilización nitrogenada ni azufrada, se aprecia que la actividad de barrido de radicales libres fue tres veces más alta a 0 g Se ha⁻¹ aplicadas, en comparación a la dosis de 60 g Se ha⁻¹. A su vez, la adición de 100 mg S kg⁻¹ suelo disminuyó la actividad de barrido de radicales libres en las plantas no tratadas con N ni Se en comparación al tratamiento 0N-0S-0Se, lo que fue acompañado por una menor acumulación de TBARS en las plantas que recibieron sólo 100 mg S kg⁻¹ suelo (Figura 14). Lo anteriormente expuesto denota la importancia de las relaciones nutricionales N-S-Se en el balance metabólico entre la producción de ROS y la capacidad de compuestos antioxidantes de contrarrestar el estrés oxidativo en *Lolium perenne*.

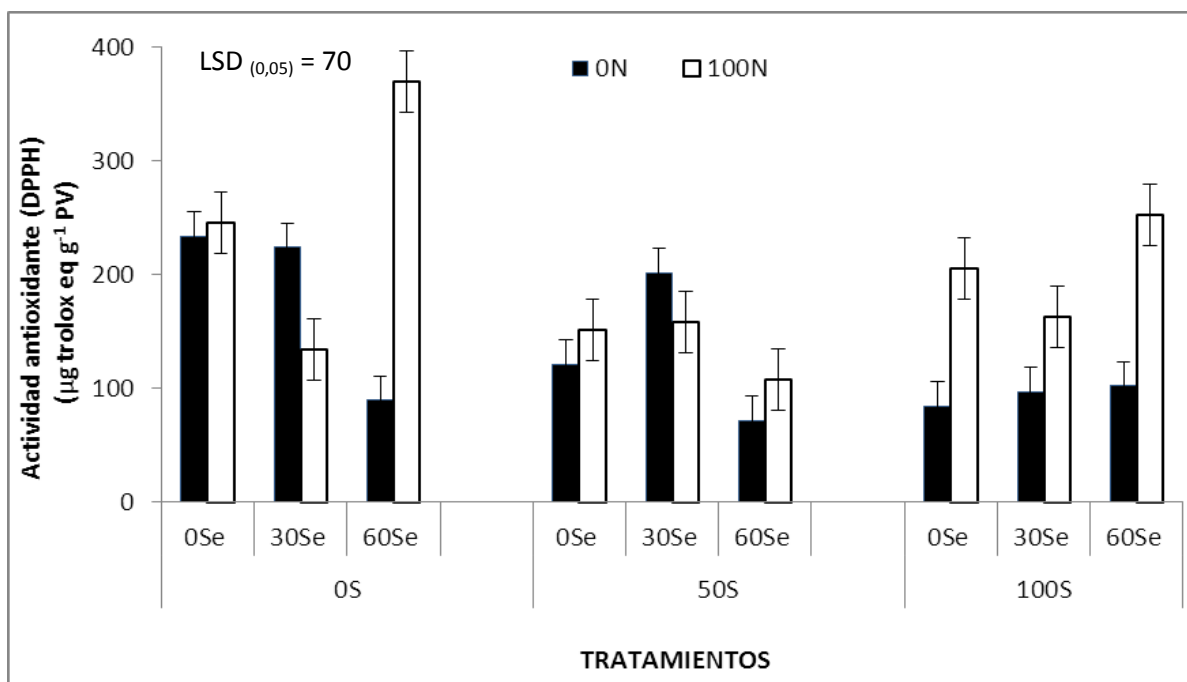


Figura 17. Actividad de barrido de radicales libres (DPPH) en plantas de *Lolium perenne* cv. Quartet a dosis crecientes de aplicación de nitrógeno, azufre y selenio. Los valores representan el promedio de tres repeticiones por cada tratamiento $\pm$ desviación estándar.

4.5 Relaciones entre parámetros químicos y bioquímicos del ensayo

Se realizó un análisis de correlación de Pearson para las variables respuestas del ensayo (Cuadro 5), según el cual se observó que la peroxidación de lípidos (TBARS) está correlacionada negativamente con la concentración de Se foliar de la planta ($r = -0,299$; $p \leq 0,05$) indicando que a mayor concentración de Se foliar en hojas de *Lolium perenne*, el daño oxidativo a membranas biológicas disminuye lo que se traduce en una disminución del estrés oxidativo. Así, los menores valores de peroxidación lipídica fueron alcanzados a una concentración de Se foliar de $668.03 \pm 39,61$ Se foliar $\mu\text{g kg}^{-1}$, el cual correspondió al tratamiento 0N-0S-30Se.

La actividad de la POD mostró una correlación positiva ($r = 0,527$; $p \leq 0,01$) con la concentración de Se foliar; esto implica que hubo un incremento de la actividad de las enzimas oxidorreductasas que desintoxican H_2O_2 en la planta por efecto del selenito aplicado. Además, se observó que la actividad del barrido de radicales libres (DPPH) estuvo inversamente correlacionada ($r = -0,30$; $p \leq 0,05$) con la actividad POD lo que indica que a través de mecanismos homeostáticos las plantas regularían la desintoxicación de ROS a través de mecanismos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos.

Cuadro 5. Correlaciones de Pearson entre las actividades y concentraciones de las variables respuestas del ensayo.

	Se foliar	N foliar	S Foliar	DPPH	TBARS	POD	SOD
Se foliar	-						
N foliar	-0,109	-					
S Foliar	-0,195	0,269*	-				
DPPH	-0,057	0,150	-0,179	-			
TBARS	-0,299*	-0,048	-0,108	0,103	-		
POD	0,527**	-0,057	-0,240	-0,300*	-0,014	-	
SOD	-0,149	0,110	-0,083	0,041	0,251	-0,031	-

*La correlación es significativa al nivel $\leq 0,05$

**La correlación es significativa al nivel $\leq 0,01$

De esta manera, cuando aumenta la actividad POD, la acción de compuestos antioxidantes disminuye, posiblemente debido a que la actividad enzimática POD estaría reduciendo una mayor cantidad de peróxidos de hidrogeno presente en las células, por lo que disminuye el requerimiento de la acción de los compuestos antioxidantes. Por el contrario, cuando la actividad enzimática de la POD disminuye, la planta genera respuesta antioxidante a través del aumento de los compuestos antioxidantes (DPPH) para desintoxicar el exceso de peróxidos que inducirían estrés oxidativo.

El N foliar exhibió una correlación positiva con el S foliar ($r = 0,269$; $p \leq 0,05$), lo que indica que a mayor concentración de N foliar existe una mayor concentración de S foliar. Esta relación se puede atribuir a que ambos elementos se requieren para la biosíntesis de aminoácidos azufrados y otros compuestos en las células de las plantas.

Aunque la enzima superóxido dismutasa (SOD) no registró una correlación significativa con la concentración de Se foliar, podemos observar en la Figura 18 que existe una tendencia a la disminución en la actividad de la enzima hasta una concentración de Se foliar de $800 \pm 1,4 \mu\text{g kg}^{-1}$. Esta disminución podría atribuirse a que el Se generaría un efecto de reducir la necesidad de la enzima SOD favoreciendo la dismutación espontánea de los aniones superóxido (Hartikainen et al, 2000; Cartes et al, 2010), por lo cual la actividad de la enzima disminuye pero se mantiene el efecto antioxidante en la planta a través de la fertilización con Se. Posteriormente, a una concentración foliar de $1000 \mu\text{g Se kg}^{-1}$ la actividad enzimática comienza a aumentar posiblemente debido a la producción de una mayor cantidad de peróxido de hidrógeno en respuesta de la mayor concentración de Se lo que indicaría que el Se podía estar actuando como prooxidante (Hartikainen et al., 2000; Breznik et al., 2004; Nowak et al., 2004; Aggarwal et al., 2010).

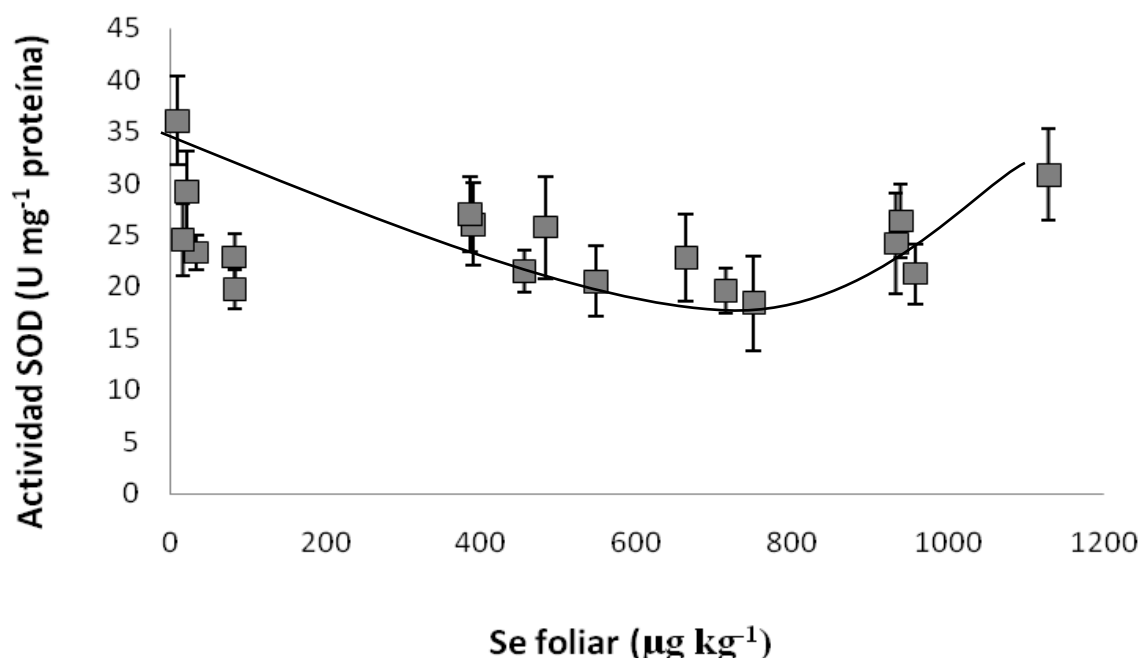


Figura 18. Efecto de la concentración de Se foliar sobre la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en *Lolium perenne* al aplicar selenito de sodio en dosis de 0-30-60 g ha⁻¹.

5 CONCLUSIONES

La peletización de semillas de *Lolium perenne* con selenito constituye una herramienta efectiva para incrementar la concentración de Se foliar a niveles compatibles con los requerimientos nutricionales del ganado.

La concentración de Se foliar de *Lolium perenne* aumentó gradualmente a dosis crecientes de aplicación de Se (30 y 60 g ha⁻¹), sin generar efecto negativo sobre el rendimiento del cultivar Quartet. No obstante, la concentración de Se foliar disminuyó significativamente por la acción combinada del N y S aplicados al suelo.

La fertilización con distintos niveles de N, S y Se afectó diferencialmente el sistema antioxidante de las plantas. Mientras que, en ausencia de fertilización nitrogenada, la aplicación de 50 mg S kg⁻¹ suelo y 30 ó 60 g Se ha⁻¹ aumentaron la actividad de la enzima peroxidasa (POD) y disminuyeron la peroxidación lipídica (TBARS), la fertilización con 100 mg S kg⁻¹ suelo y 60 g Se ha⁻¹ incrementaron el daño oxidativo a membranas.

La aplicación combinada de N (100 mg kg⁻¹ suelo), S (100 mg kg⁻¹ suelo) y Se (60 g ha⁻¹) aumentó significativamente la calidad nutritiva de *Lolium perenne* cv. Quartet y contribuyó a mejorar el sistema antioxidante, disminuyendo así el estrés oxidativo de las plantas.

6 RESUMEN

Se realizó un experimento en invernadero con plantas de *Lolium perenne* L. cv. Quartet cultivadas en un Andisol del Sur de Chile para evaluar el efecto de la peletización de semillas con selenito (0, 30 ó 60 g Se ha⁻¹) sobre la absorción de selenio (Se) y su función antioxidante bajo distintos niveles de fertilización con nitrógeno (0 ó 100 mg N kg⁻¹) y azufre (0, 50 ó 100 mg S kg⁻¹).

Los resultados indicaron que la peletización de semillas con selenito aumentó progresivamente la concentración de Se foliar y no afectó el rendimiento de las plantas. Sin embargo, la acumulación de Se en el follaje fue significativamente reducida por efecto fertilización con N y S aplicada al suelo.

Además, el sistema antioxidante de las plantas exhibió respuestas diferenciales a la fertilización con N, S y Se. Cuando no se aplicó N, la adición de 50 mg S kg⁻¹ y 30 ó 60 g Se ha⁻¹ activaron la enzima peroxidasa y disminuyeron la peroxidación lipídica. Sin embargo, la fertilización con 100 mg S kg⁻¹ y 60 g Se ha⁻¹ aumentaron el daño oxidativo.

Por otra parte, la calidad nutritiva de *L. perenne* cv. Quartet aumentó significativamente debido a la aplicación combinada de 100 mg N kg⁻¹ suelo, 100 mg S kg⁻¹ suelo y 60 g Se ha⁻¹. Además, estos niveles de fertilización contribuyeron a mejorar el sistema antioxidante, disminuyendo así el estrés oxidativo de las plantas.

7 SUMMARY

A greenhouse experiment was conducted with plants of *Lolium perenne* L. cv. Quartet cultivated on an Andisol of Southern Chile to evaluate the effect of seed pelletization with selenite (0, 30 or 60 g Se ha⁻¹) on Se uptake and its antioxidant function under different of nitrogen (0 ó 100 mg N kg⁻¹) and sulfur (0, 50 ó 100 mg S kg⁻¹) fertilization levels.

The results indicated that seed pelletization with selenite progressively increased the shoot Se concentration, without any effect on the plant yield. However, Se accumulation in the shoots was significantly reduced by effect of the N and S fertilization applied to the soil.

Furthermore, the antioxidant system of plants exhibited differential responses to N, S and Se fertilization. When no N was applied, the addition of 50 mg S kg⁻¹ and 30 ó 60 g Se ha⁻¹ activated peroxidase enzyme and decreased lipid peroxidation. However, the fertilization with 100 mg S kg⁻¹ and 60 g Se ha⁻¹ increased the oxidative damage.

On the other hand, the nutrient quality of *L. perenne* cv. Quartet was significantly raised due to the combined application of 100 mg N kg⁻¹, 100 mg S kg⁻¹ and 60 g Se ha⁻¹. In addition, these fertilization levels contributed to improve the antioxidant system, and thus to diminish the oxidative stress in plants.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aggarwal, M., S. Sharma, Kaur N., Pathania D. y K. Bhandhari Bhandhari Aggarwal, M., S. Sharma, Kaur N., Pathania D. y K.*et al.*, (2010). Exogenous proline application reduces phytotoxic effects of selenium by minimising oxidative stress and improves growth in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. Biological trace element research, 10.1007/s12011-010-8699-9.

Apel, K. and H. Hirt, (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction. Annual review of plant biology, 55: 373-399.

Asher CJ, Butler GW, Peterson PJ (1977). Selenium transport in root systems of tomato. Journal of experimental botany, 28:279–291

Avello, M., Suwalsky, M. (2005). Radicales libres, Estrés oxidativo y defensa antioxidante celular. Proyecto FONDECYT (1020476) y DIUC (204.074.037-1.0). 6 p.

Azcón B, Talón M (2000). Fundamentos de la Fisiología Vegetal. 550p. MacGraw-Hill, 2ª ed. Barcelona, España.

Barceló, J., Poschenrieder C. (2000). Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. *Environmental and experimental botany*, 48: 75-92.

Barceló J., Nicolás G., Sabater B. and Sánchez R. (2001). *Fisiología Vegetal*. 560 p. Ediciones Pirámide, Madrid, España.

Barrow, N. J. (1992). The effect of time on the competition between anions for sorption. *Journal of soil science*, 43: 421-428.

Barrow N. (1999). The four laws of soil chemistry: the beeper lecture 1998. *Australian journal of soil research*, 37: 787-830.

Becvort, A. A. (2011). Acumulación de selenio en tomate y su efecto en el crecimiento, productividad y capacidad antioxidante del fruto. Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”. Subdirección de postgrado. Coahuila, México. 40 p.

Benavides- Mendoza, A. (1998). El Azufre en las plantas. Departamento de Horticultura, UAAAN. 7 p.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72: 248-254.

Breznik, B., M.Germ, A. Gaberscik and I. Kreft, (2004). The combined effects of elevated UV-B radiation and selenium on Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) habitus. *Fagopyrum*, 21: 49-64.

Broadley, M.R., P.J. White, R.J. Bryson, M.C. Meacham, H.C. Bowen, S.E. Johnson, M. J. Hawkesford, S.P. McGrath, F.J. Zhao, N. Breward, M. Harriman and M. Tucker. (2006). Biofortification of UK food crops with selenium. *Proceedings of the nutrition society*, 65: 169-181.

Brown T. and Shrift A. (1982). Selenium: toxicity and tolerance in higher plants. *Biological Reviews*, 57: 59-84.

Cartes, P., L. Gianfera and M.L. Mora, (2005). Uptake of selenium and its antioxidative activity in ryegrass when applied a selenate and selenite forms. *Plant Soil*, 276: 359-367.

Cartes P, Shene C and Mora M.L. (2006). Selenium distribution in ryegrass and its antioxidant role as affect by sulfur fertilization. *Plant Soil* 285, 187-195.

Cartes, P., A.A. Jara, L. Pinilla, A. Rosas and M.L. Mora, (2010). Selenium improves the antioxidant ability against aluminium-induced oxidative stress in ryegrass roots. *Annals of Applied Biology*, 156: 297-307.

Cartes, P., L. Gianfreda, C. Paredes and M.L. Mora. (2011). Selenium uptake and its antioxidant role in ryegrass cultivars as affected by selenite seed pelletization. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 2011, 11 (4), 1-14.

Chen, C.C. and J.M. Sung, (2001). Priming bitter gourd seeds with selenium solution enhances germinability and antioxidative responses under sub-optimal temperature. *Plant Physiology*, 111: 9-16.

Cortes, R. C., Villagómez M. E., Avalos S. M., Molina A. S. (2009). Influencia de la peroxidación de lípidos sobre el daño oxidativo mitocondrial y la integridad de *Saccharomyces cerevisiae*. *Información tecnológica*. Vol. 20(2): 71-81.

Demagnet, R. (2007). Ballica Perenne en pasturas para producción de leche. Programa de desarrollo de proveedores 2004-2007. 11 p.

Demagnet, R. (2008). Manual de Especies Forrajeras y Manejo de Pastoreo. Plan Desarrollo Lechero Watt's. Área agropecuaria Watt's S.A. 199 p.

Demagnet, R. F. (2011). _Praderas y Pasturas en Sistemas Pastoriles. Prodesal, Pucón. 26p.

Djanaguiraman, M., D.D. Devi, A.K. Shanker, A., Sheeba and U. Bangarusamy, (2005). Selenium -an antioxidative protectant in soybean during senescence. *Plant Soil*, 272: 77-86.

Donahue, J.L., Opudu, C.M., Cramer, C.L., Grabau, E.A. and Alscher, R.C. (1997). Responses of antioxidants to Paraquat in pea leaves. Relationships to resistance. *Plant Physiology*, 113: 249-257.

Du, Z. y Bramlage, W. (1992). Modified thiobarbituric acid assay for measuring lípido oxidation in sugar-rich plant tissue extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40: 1566-1570.

Dungan, R. S. and Frankenberger, W. T. (1999). Microbial transformations of selenium and the bioremediation of seleniferous environments. *Biorem. J.* 3 : 171-188.

Ellis, D.R. and D.E. Salt, (2003). Plants, selenium and human health. *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 273-279.

Feng, W. X, Xiang, Q. C. and Ming, W. S. (2010). Effects of Nitrate Supply Site on Selenite Uptake by Rice Roots. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58, 11075–11080

Fishbein L. (1991): II25 Selenium. In: Merian E. (ed.): *Metals and Their Compounds in the Environment. Occurrence, Analysis, and Biological Relevance*. VCH Weiheim-New York-Basel-Cambridge: 1153–1190.

Flohe, L., W.A. Gunzler and H.H. Schock, (1973). Glutathione peroxidase: A selenoenzyme. *Federation of European Biochemical Societies*, 32: 132-134.

Goh, D.H., Ming, Y., Suen, E.K., and Lim, E.P. (2004). Design lessons on access features in PAPER. Proceedings of the 7th International Conference on Asian Digital Libraries ICADL 2004, December 13-17, Shanghai, China, Lecture Notes in Computer Science 3334, 594-607.

Gomez, C.G., M. Rinaudo, B, M.A. Villar. (2007). Oxidation of sodium alginate and characterization of the oxidized derivatives. Science Direct. Carbohydrate Polymers. 67: 296-304.

Gratao, P.L., A. Polle, P.J. Lea and R.A. Azevedo, (2005). Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Funct. Plant Biology*, 32: 481-494.

Hannaway, D. B.; Fransen, S.; Cropper, J.; Teel, M.; Chaney, M.; Griggs, T.; Halse, R.; Hart, J.; Cheeke, P.; Hansen, D.; Klinger, R.; Lane, W., (1999). Perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). Pacific NorthWest Extension Publications. Oregon State University, USA.

Hartikainen, H., T.L. Xue and V. Piironen, (2000). Selenium as an anti-oxidant and pro-oxidant in ryegrass. *Plant Soil*, 225: 193-200.

Hatano T, Kagawa H, Yasuhara T, Okuda T. (1988) Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 36:2090–2097

Hartikainen, H. and T. Xue, (1999). The promotive effect of selenium on plant growth as triggered by ultraviolet irradiation. *Journal of Environmental Quality*, 28: 1372-1375.

Heath, R. and Packer, L. (1968). Photoperoxidation in insolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics, 125 : 189-198.

Hopper J and Parker D. (1999). Plant availability of selenite and selenate as influenced by the competing ions phosphate and sulfate. Plant Soil. 210, 199-207.

Jiang, L., Phillips, T., Hamm, C., Drozdowicz, Y., Rea, P., Maeshima, M., Rogers, S. y Rogers, J. (2001). The protein storage vacuole: a unique compound organelle. The Journal of Cell Biology. 155 (6):991- 1002.

Kahakachchi, C., H.T. Boakye, P.C. Uden and J.F. Tyson, (2004). Chromatographic speciation of anionic and neutral selenium compounds in Se-accumulating *Brassica juncea* (Indian mustard) and in selenized yeast. Journal of Chromatography A, 1054: 303-312.

Kubik, M.Y., Lytle, L.A., Story, M., (2001). A practical, theory-based approach to establishing school nutrition advisory councils. JADA 101, 223–228.

Kumpulainen J, Raittila A M, Lehto J and Koivistoinen P. (1983). Electrolthermal atomic absorption spectrometric determination of selenium in foods and diets. Journal of the Association of Official Analytical Chemists. 66, 1129-1135

Kruze, J., A. Ceballos, H. Stryhn, A. Mella, R. Matamoros, P. A. Contreras, V. Leyan, F. Wittwer. (2000). Somatic Cell Count in Milk of Selenium-supplemented Dairy Cows after an Intramammary Challenge with *Staphylococcus aureus*. Journal of Veterinary Medicine Series A. 54: (9) 478–483.

Li, H.F., McGrath, S.P., Zhao, F.J. (2008). Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite. New Phytologist. 178, 92-102.

Lopez, M., Miranda M. and Hernandez J. (1997). Glutathione peroxidase (GSH-Px) in ruminants associated to selenium deficiency pathologies. Archivos de Medicina Veterinaria Vol. 29 nº 2.

Maldonado M.A., Favela T.E., Rivera C.F. y Volke S.T.L. (2011). Lead bioaccumulation in *Acacia farnesiana* and its effect on lipid peroxidation and glutathione production. Plant and Soil. 339, 377-389.

Martens D. A. and D. L. Suarez. (1997). Selenium Speciation of Marine Shales, Alluvial Soils, and Evaporation Basin Soils of California. Reprinted from the Journal of Environmental Quality Volume 26.

Menter, D. G.; Sabichi, AL.; Lippman, SM. Selenium effects on prostate cell growth. Cancer Epidemiology Biomarkers Prev. (2000). Nov; 9.(11):1171-82.

Mora, M.L., Pinilla, L., Rosas, A., Cartes, P. (2008). Selenium uptake and its influence on the antioxidative system of white clover as affected by lime and phosphorus fertilization. Plant and Soil. 303,139- 149.

Munne-Bosch, S. and L. Alegre, (2002). The functions of tocopherols and tocotrienols in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21: 31-57.

Munne-Bosch, S., (2005). The role of α -tocopherol in plant stress tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 162: 743-748.

National Research Council (NRC). (2000). *Nutrients Requirements of Beef Cattle*. Committee on Animal Nutrition. National Academy Press, Washington, D. C. 232 p.

Neal, R. H., Sposito, G., Holtzclaw, K. M. and Traina, S. J. (1987). Selenite absorption on alluvial soils : I. Soil composition and pH effects. *Soil Science Society of America Journal* 51 : 1161-1165.

Neal, R.H., (1995). Selenium. In: *Heavy Metals in Soils*, Alloway, B.J. (Ed.). Blackie Academic and Professional, London, pp: 260-283.

Nowak, J., K. Kaklewski and M. Ligocki, (2004). Influence of selenium on oxidoreductive enzymes activity in soil and in plants. *Soil Biology & Biochemistry*, 36: 1553-1558.

Opitz, O. (2002). Tercera temporada de evaluación de nueve cultivares de *Lolium perenne* L. bajo pastoreo con vacas lecheras. Tesis de pregrado, Ing. Agrón. Universidad Austral de Chile. Fac. Cien. Agrar. Esc. Agron. Valdivia, Chile.

Pardo MT, Guadalix ME (1994) Chemical factors affecting selenite sorption by allophanic soils. *Geoderma* 63:43–52.

Pedrero, Z., Y. Madrid, H. Hartikainen and C. Camara, (2008). Protective effect of selenium in broccoli (*Brassica oleracea*) plants subjected to cadmium exposure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 56: 266-271.

Peng, X.L., Y.Y. Liu and S.G. Luo, (2002). Effects of selenium on lipid peroxidation and oxidizing ability of rice roots under ferrous stress. *Journal of Northeast Agricultural University* , 19: 9-15.

A., T. Xue and H. Hartikainen, (2002). Protective role of selenium in plant subjected to severe UV irradiation stress. *Journal of Applied Botany and Food Quality* ., 76: 66-76.

Pesutic, D., V. Leyan., G. Schuring., F. Wittwer., P. Contreras., J. Kruze., R. Matamoros. (2001). Efectos de una dieta selenio-deficiente sobre la respuesta inmune a la vacuna RB51 en vaquillas de pastoreo. V Jornadas Chilenas de Buiatría. Puerto Varas-Chile. Pp. 141-142.

Pereyra, M. C. (2001). Asimilación del nitrógeno en plantas. Universidad de la Pampa, Facultad de Agronomía. 16 p.

Pinhero RG, Rao MV, Palivath G, Murr DP, Fletcher RA (1997). Changes in activities of antioxidant enzymes and their relationship to genetic and paclobutrazol-induced chilling tolerance of maize seedlings. *Plant Physiology*, 114:695–704

Qi, X., Y.Y. Liu and T.X. Song, (2004). Effects of selenium on root oxidizing ability and yield of rice under ferrous stress. *Journal of Northeast Agricultural University*, 11: 19-22.

Rios, J.J., B. Blasco, L.M. Cervilla, M.A. Rosales, E. Sanchez-Rodriguez, L. Romero and J.M. Ruiz, (2009). Production and detoxification of H₂O₂ in lettuce plants exposed to selenium. *Annals of Applied Biology*, 154: 107-116.

Rios J., Blasco B., Rosales M., Sanchez E., Leyva R., Cervilla L., Romero L. and Ruiz J. (2010). Response of nitrogen metabolism in lettuce plants subjected to different doses and forms of selenium. *Society of Chemical Industry* 90: 1914–1919.

Rodríguez, R. J., Miranda, C. L., Stevens, J. F., Deinzer, M. L. and Buhler, D. R. (2001). Influence of prenylated and non-prenylated flavonoids on liver microsomal lipid peroxidation and oxidative injury in rat hepatocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 39 (5): 437-445

Rogers, P.A. M., T.F. Gately. (1992). Control of mineral imbalances in cattle and sheep. Edit. Teagasac, Dublin, Ireland.

Rosenfeld, I. and O.A. Beath, (1964). Selenium. *Geobotany, Biochemistry, Toxicity and Nutrition*. Academic Press, New York, USA, pp: 411.

Sadzawka, A. Carrasco, M., Grez, R. y Mora, M.L. (2004a). Métodos de análisis recomendados para suelos chilenos. Comisión de Normalización y Acreditación (CNA) de la Sociedad chilena de la Ciencia del Suelo. 113 p.

Sadzawka, A., Grez, R., Carrasco, A. y Mora, M.L. (2004b). Métodos de análisis de tejidos vegetales. Normalización y Acreditación (CNA) de la Sociedad chilena de la Ciencia del Suelo. 53 p.

Salisbury F., Ross C. (2000). Fisiología de las Plantas: II. Bioquímica vegetal. P. 311-523. Thomson Learning, Madrid, España.

Salisbury F., Ross C. (2000). Fisiología de las Plantas: III. Desarrollo de las plantas y fisiología ambiental. P. 529-897. Thomson Learning, Madrid, España.

Segovia, J. P. (2005). Comparación de dos fuentes de selenio (orgánico vs inorgánico) en ganancias de peso y parámetros ruminales en borregas lactantes. Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Zootecnia, Secretaría de Investigación y Posgrado, Chihuahua, México. 75p.

Silva J., Quiroga M. and Auza M. (2000). Selenio en el Rumiante: Relaciones suelo, planta , animal. Archivo Medicina Veterinaria. Vol 17, 10: 229-246.

Simojoki, A., (2003). Allocation of added selenium in lettuce and its impact on root. Agricultural and Food Science, 12: 155-164.

Singh, M., H. Singh and D.K. Bhandari, (1980). Interaction of selenium and sulphur on the growth and chemical composition of raya. Soil Science., 129: 238-244.

Stroud, J., Li, H., Lopez F., Broadley M., Foot I., Fairweather S., Hart D., Hurst R., Knott P., Mowat H., Norman K., Scott, P., Tucker M., White P, McGrath S. and Zhao, F.J. (2010). Impact of sulphur fertilisation on crop response to selenium fertilisation. *Plant and Soil* 332: 31-40.

Sreekala, M., T.R. Santosh and K. Lalith, (1999). Oxidative stress during selenium deficiency in seedlings of *Trigonella foenum-graecum* and mitigation by mirnosine. Part I. hydroperoxide metabolism. *Biological Trace Element Research.*, 70: 193-207.

Spallholz, J. and D. Hoffman, (2002). Selenium toxicity: Cause and effects in aquatic birds. *Aquat. Toxicol.*, 57: 27-37.

Taiz & Zeiger. (2002). *Plant Physiology*, Third Ed. Sinauer Associates, Inc. Chapter 10, pages 33-46.

Terry, N., A.M. Zayed, M.P. de Souza and A.S. Tarun, (2000). Selenium in higher plants. *Annu. Rev. Physiology and Molecular Biology of Plants*, 51: 401-432.

Teuber N. (2000). Las ballicas anuales y bianuales en los sistemas lecheros. Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA). *Tierra adentro* 33: 29-31 p. Chile.

Torres, M. A., Jonathan, D.G. Jones and Jeffery L. Dang. (2006). Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Plant Response to Bacterial Pathogens. 141: 373-378.

Turakainen, M., H. Hartikainen and M.M. Seppanen, (2004). Effects of selenium treatments on potato (*Solanum tuberosum* L.) growth and concentrations of soluble sugars and starch. Journal of Agricultural and Food Chemistry , 52: 5378-5382.

Vorobets, N., (2006). Glutathione peroxidase activity in sunflower shoots exposed to lead and selenium. Ann. Univ. Mariae Curie-SK Lodowska Lublin, 19: 151-154.

Werner Jaffé (1992).Selenio, un elemento esencial y toxico. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, Vol. 42, No. 2: 90-93.

Wittwer F., Araneda P., Ceballos A., Contreras P., Andaur M. and Böhmwald H. (2002). Actividad de glutatión peroxidasa (GSH-Px) en sangre de bovinos a pastoreo de la IX Región, Chile y su relación con la concentración de selenio en el forraje. Archivo Medicina Veterinaria 34: 49-57.

Wittwer, F., P. Araneda, A. Ceballos, P.A. Contreras, M. Andaur and H. Böhmwald. (2002). Actividad glutatión peroxidasa (GSH-Px) en sangre de bovinos a pastoreo de la IX Región, Chile y su relación con la concentración de selenio en el forraje. Archivo de Medicina Veterinaria, 34: 49-57.

Wright, P.L., M.C. Bell. (1966). Comparative metabolism of selenium and tellurium in sheep and swine, *Am. The Journal of Physiology*, 211:6-10.

Xue, T. and H. Hartikainen, (2000). Association of antioxidative enzymes with synergistic effect of selenium and UV irradiation in enhancing plant growth *Agricultural and Food Science*, 9: 177-186.

Xue, T., H. Hartikainen and V. Piironen, (2001). Antioxidative and growth-promoting effect of selenium in senescing lettuce. *Plant and Soil*, 27: 55-61.

Xu, J., X. Yao and Z. Zhang, (2010). Responses of wheat seedlings to exogenous selenium supply under cold stress. *Biological Trace Element Research*, 136: 355-363.

Zhang, P. and Sparks, D. (1990). Kinetics of selenate and selenite absorption/desorption at goethite/water interface. *Environ. Environmental Science & Technology*, 24 : 1848-1856.

Zayed, A.M., C.M. Lytle and N. Terry, (1998). Accumulation and volatilization of different chemical species of selenium by plants. *Plant and Soil*, 206: 284-289.