

Damara Benazir Damas Solano

“ Efecto del estrés oxidativo en *Phaseolus vulgaris* variedad Pinto Saltillo ante la bioacumulación de cadmio”

2022



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química

“Efecto del estrés oxidativo en *Phaseolus vulgaris* variedad Pinto Saltillo ante la bioacumulación de cadmio”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestra en Ciencia y Tecnología Ambiental

Presenta

I.A. Damara Benazir Damas Solano

Dirigido por:

Dr. Miguel Ángel Rico Rodríguez

Querétaro, Qro. a febrero, 2022



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Química
Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental

**“Efecto del estrés oxidativo en *Phaseolus vulgaris* variedad Pinto Saltillo
ante la bioacumulación de cadmio”**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestra en
Ciencia y Tecnología Ambiental

Presenta

I. A. Damara Benazir Damas Solano

Dirigido por

Dr. Miguel Ángel Rico Rodríguez

<u>Dr. Miguel Ángel Rico Rodríguez</u>	Firma
Presidente	
<u>Dr. Víctor Pérez Moreno</u>	Firma
Secretario	
<u>M.en C. Juan Antonio Valencia Hernández</u>	Firma
Vocal	
<u>Dr. Juan Campos Guillén</u>	Firma
Suplente	
<u>Dr. Ramón Gerardo Guevara González</u>	Firma
Suplente	

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

febrero, 2022, México.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por la vida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) por el apoyo con la beca Nacional de Posgrado la cual me permitió realizar este trabajo.

A los docentes y administrativos de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro (**UAQ**) y al Centro de Estudios Académicos sobre Contaminación Ambiental (**CEACA**).

Al honorable cuerpo de sinodales:

- Muy en especial al Dr. Miguel Ángel Rico Rodríguez, por sus enseñanzas de vida y académicas, por su confianza y amistad.
- M. en C. Juan Antonio Valencia Hernández por su ayuda y guía en cada paso de este proyecto, por su tolerancia y amistad.
- Dr. Víctor Pérez Moreno, Dr. Juan Campos Guillén, por sus aportaciones en la revisión y corrección de esta tesis.
 - Dr. Ramón Gerardo Guevara González por permitirme usar las instalaciones del **Laboratorio de Biotecnología** a su cargo y por sus aportaciones al escrito.

A mis amigos y compañeros de maestría, gracias por tan lindos recuerdos y por permitirme aprender de ustedes (Kari, Jessi, Rox, Caro, Vale, Loyer, Linnet, Mike, Malu). A mis amigos de años (Katia y Juan Pablo) por estar conmigo en las buenas y en las malas, y por darme siempre palabras de aliento.

DEDICATORIAS

A **DIOS** por brindarme la fortaleza e inspiración para culminar este proyecto.

A mis padres **Abraham Joaquín Damas Zapot** y **Carmen Catalina Solano Pastelín** por ser los principales motores de mi vida, formarme con disciplina y amor; gracias por confiar en mí, ustedes serán siempre mi principal fuente de inspiración.

A mi hermano **Abraham** porque con su sola presencia me brinda fuerzas para continuar con mis metas.

A mis abuelitos Juana Pastelín Méndez y José Arnulfo Solano Vargas porque siempre han tenido fé en mí, por sus consejos y gran cariño.

A mis tíos Elivia y Gamaliel por estar siempre para mi y quererme.

A mis tíos Sagrario, Eduardo, José y Andrea por apoyarme en mis sueños, por sus abrazos y palabras de aliento que siempre me recordaron de lo que soy capaz.

A Rebeca y Romina por animarme con sus sonrisas. Las amo chers.

A mis familiares y a aquellas bellas personas que sin compartir lazos de sangre fueron partícipes de todo este proceso y siempre me alentaron con su afecto y consejos.

Índice General

AGRADECIMIENTOS

DEDICATORIAS

Índice de cuadros

Índice de figuras

Resumen.....	1
Abstract	2
1. Introducción	3
2. Justificación	5
3. Antecedentes	6
3.1. El suelo.....	6
3.2. Situación del suelo en México	6
3.3. Metales pesados.....	7
3.4. Contaminación de suelo por cadmio	8
3.5. Toxicología del Cadmio	9
3.6. Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo.....	13
3.7. Sistema de defensa antioxidante.....	14
3.8. Biorremediación y bioacumulación.....	16
3.8. <i>Phaseolus vulgaris</i>	21
4. Hipótesis.....	26
5. Objetivos.....	27
5.1. Objetivo general	27
5.2. Objetivo específico	27

6. Metodología.....	28
6.1 Caracterización fisicoquímica de suelos	28
6.1.1. Obtención de suelo	28
6.1.2. Análisis fisicoquímico del suelo	28
6.2. Determinación de la concentración de Cd en suelo mediante absorción atómica por la técnica de flama	28
6.2.1. Digestión de las muestras de suelo.....	28
6.2.2. Determinación de Cd en suelo	29
6.3. Bioensayos	30
6.4. Prueba de germinación.....	30
6.5. Tratamiento con Cd en arena como sustrato y suelo proveniente de Maconí, Cadereyta de Montes.....	31
6.5.1. Cultivo de semilla de frijol	32
6.6. Cuantificación de Cd en planta y análisis de morfología vegetal	33
6.6.1. Medición de tallo y hojas	33
6.6.2. Determinación de Cd en tejido vegetal.....	33
6.6.3 Factor de bioacumulación	34
6.7. Actividad enzimática.....	34
6.7.1. Fenilalanina-amonio liasa	34
6.7.2. Catalasa	36
6.7.3. Superóxido dismutasa	37
6.7.4. Determinación de proteína	38
6.8. Análisis estadístico.....	39
7. Resultados y discusión.....	40
7.1. Caracterización fisicoquímica de los suelos.....	40
7.2. Efecto de Cd en el desarrollo de <i>Phaseolus vulgaris</i>.....	42
7.2.1. Prueba de germinación	42

7.3. Cuantificación de Cd en arena y el suelo proveniente de Maconí, Cadereyta de Montes.	43
7.3.1. Determinación del factor de bioacumulación de Cd	46
7.4. Efecto en el crecimiento y desarrollo de la planta	47
7.4.1 Tallo y altura	47
7.5. Enzimáticos	51
7.5.1. Resultados de actividad PAL	51
7.5.2. Resultados de actividad SOD	53
7.5.3. Resultados de actividad CAT	54
7.5.2. Resultados de proteína	56
7.5.3. Resultados de semillas	57
8. Conclusiones	60
9. Referencias	61

Índice de cuadros

Cuadro 1. Algunas vías de exposición de Cd.....	10
Cuadro 2. Efectos crónicos en la salud por exposición en agua potable (EPA, 2007).....	11
Cuadro 3. Ejemplo de familias y géneros de plantas bioacumuladoras de metales pesados (Ali et al., 2013).	17
Cuadro 4. Taxonomía del frijol.....	23
Cuadro 5. Cuadro 5. Características agronómicas del Frijol Pinto Saltillo (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias ,2006).	23
Cuadro 6. Diseño experimental	31
Cuadro 7. Propiedades físicas de los suelos utilizados en el experimento.	41
Cuadro 8. Prueba de germinación de P. vulgaris.	43
Cuadro 9. Concentración de Cd en suelo durante los 4 muestreos realizados durante la experimentación.....	44
Cuadro 10. Concentración de Cd en hoja durante los 4 muestreos realizados durante la experimentación.....	45
Cuadro 11. Índice de bioacumulación de Cd en Phaseolus vulgaris.....	47
Cuadro 12. Alturas de P. vulgaris en los diferentes tratamientos	49
Cuadro 13. Tallo de P. vulgaris en los diferentes tratamientos	50
Cuadro 14. Cuadro 14. Resultados de las etapas fenológicas del bioensayo.	51
Cuadro 15. Actividad PAL.....	52
Cuadro 16. Actividad SOD.....	54
Cuadro 17. Actividad CAT durante los 4 muestreos realizados.	56
Cuadro 18. Proteína.....	57
Cuadro 19. Resultados de los análisis realizados en semilla de P. vulgaris.	57
Cuadro 20. Número de semillas por tratamiento.	58

Índice de figuras

Figura 1. Producción de ERO durante la reducción de O ₂ (Imlay, 2008; Gill y Tuteja 2010).....	14
Figura 2. Respuesta de las plantas ante la presencia de metales pesados en suelo (Portalfruticola, 2019).....	20
Figura 3. Representación esquemática del sitio donde se obtuvo el suelo de Maconí con sus respectivos puntos de recolección.	28
Figura 4. Horno de microondas Anton Par utilizado para la digestión.....	29
Figura 5. Macetas de <i>P. vulgaris</i> sembradas en arena de río y suelo de Maconí.	30
Figura 6. Muestras vegetales utilizadas para pruebas enzimáticas.	35
Figura 7. a)Muestras expuestas a luz solar b)Cambio en la coloración	37
Figura 8. a) Hoja de <i>P. vulgaris</i> en condiciones normales, b)Hoja de <i>P. vulgaris</i> elicitada con Cd.	46
Figura 9. <i>P. vulgaris</i> durante sus primeras etapas fenológicas.	48
Figura 10. Semillas del bioensayo. a)Testigo, b)Tratamiento 1, c) Tratamiento 2, d)Tratamiento 3.....	59

Resumen

La concentración de metales pesados aumenta continuamente en suelos, principalmente por actividades antropogénicas. Entre ellos el cadmio (Cd), ha sido identificado como de mayor riesgo debido a su comportamiento bioacumulable en organismos vivos accediendo así a la cadena alimenticia. Al poder acumularse en plantas de consumo el análisis de sus efectos en células vegetales es importante para comprender los mecanismos de defensa y las estrategias de adaptación de las plantas contra toxicidad. Se realizaron muestreos de parte vegetal y de suelo a los 20, 60, 90 días y al final del experimento para análisis posteriores. En este trabajo se evaluó la capacidad de bioacumulación de Cd y su relación con el estrés oxidativo en *Phaseolus vulgaris* variedad Pinto Saltillo. Para ello, se desarrollaron plantas de frijol en macetas con arena de río y con un suelo colectado de la localidad de Maconí municipio de Querétaro a los que se les realizó caracterización fisicoquímica. Las macetas con arena se doparon con 70 (Tratamiento 1) y 100 (Tratamiento 2) mg de Cd, al suelo colectado se le cuantificó su contenido de Cd y se utilizó el resultado para el tratamiento 3. Se determinó bioacumulación en hojas, semilla y suelo. También se examinó el impacto en el estrés oxidativo mediante análisis de actividad de SOD, CAT y PAL. Se observó que la concentración de Cd presente en suelo disminuyó de 110.374 mgkg⁻¹ a 50.326 mgkg⁻¹ en la concentración más elevada y en hoja aumento de 0.465 mgkg⁻¹ a 5.446 mgkg⁻¹. También se observó engrosamiento del tallo a elevadas concentraciones y crecimiento retardado. Para los análisis enzimáticos En los resultados de tratamiento 2 PAL aumentó en un 127 % durante los dos primeros muestreos, en los muestreos 3 y 4 disminuye la actividad de SOD debido a inhibición de su producción. Para CAT en el tratamiento 1 se observa menor actividad 2.534 Ug⁻¹ en contraste con el tratamiento 2 donde aumento 2.912 Ug⁻¹. El metal no fue capaz de traslocarse a la semilla y la actividad enzimática de las mismas no se vió alterada.

Palabras clave: Metales pesados, enzimas, frijol, contaminación de suelos.

Declaración de responsabilidad de estudiante: Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

Abstract

The concentration of heavy metals is continually increasing in soils, mainly due to anthropogenic activities. Among them, cadmium (Cd) has been identified as a higher risk due to its bioaccumulative behavior in living organisms, thus accessing the food chain. As it can accumulate in consumer plants, the analysis of its effects on plant cells is important to understand the defense mechanisms and adaptation strategies of plants against toxicity. Plant and soil tests were performed at 20, 60, 90 days and at the end of the experiment for further analysis. In this work, the bioaccumulation capacity of Cd and its relationship with oxidative stress in *Phaseolus vulgaris* variety Pinto Saltillo was evaluated. To do this, bean plants were grown in pots with river sand and soil collected from the locality of Maconí, municipality of Querétaro, to which physicochemical characterization was carried out. The pots with sand were doped with 70 (Treatment 1) and 100 (Treatment 2) mg of Cd, the collected soil was quantified for its Cd content and the result was used for treatment 3. Bioaccumulation will be extended in leaves, seeds and I usually. The impact on oxidative stress will also be produced by analysis of SOD, CAT and PAL activity. It will be eliminated that the concentration of Cd present in the soil ended from 110.374 mgkg⁻¹ to 50.326 mgkg⁻¹ in the highest concentration and in the leaf, it increased from 0.465 mgkg⁻¹ to 5.446 mgkg⁻¹. Stem thickening at high concentrations and retarded growth were also demonstrated. For the enzymatic analyzes the results of treatment 2 PAL increased by 127 % during the first two demonstrated, in the demonstrated 3 and 4 decreasing the activity of SOD due to an inhibition of its production. For CAT in treatment 1, less activity is observed 2,534 Ug⁻¹ in contrast to treatment 2 where it increases 2,912 Ug⁻¹. The metal was not able to translocate to the seed and their enzymatic activity was not altered.

Keywords: Heavy metals, enzymes, beans, soil contamination

1. Introducción

Los metales pesados son un problema a nivel mundial debido a su nula biodegradabilidad, alta toxicidad y capacidad de bioacumularse. Su concentración en suelos ha ido en aumento principalmente por actividades antropogénicas, distribuyéndose en cultivos y biomagnificándose a través de la cadena alimenticia (Mansour y Sidky, 2002; Martorell, 2010; Jiménez, 2017; Liu *et al.*, 2018)

El cadmio (Cd) es un metal de transición altamente tóxico a bajas concentraciones, su movilidad y biodisponibilidad depende de la forma química que adopte además, tiene efectos crónicos en todos los seres vivos. Se estima que cada año se liberan 30,000 ton al medio ambiente (Järup y Åkesson, 2009; Cullen y Maldonado, 2013).

En México la mayor concentración de Cd se genera como resultado de actividades mineras, debido al inadecuado manejo y disposición de residuos creando "Jales mineros" en estados como San Luis Potosí, Guerrero, Querétaro, Zacatecas y Sonora (Mireles *et al.*, 2012; Cortés *et al.*, 2013). Pérez *et al.* (2015) estudiaron un suelo de San Luis Potosí para determinar la cantidad de Cd presente, encontraron presencia de de este y otros metales tóxicos en las muestras analizadas.

En la región semidesértica de Querétaro más específico en el municipio de Cadereyta de Montes la minería se practica desde varios años atrás, también es un lugar que destina parte de la mano de obra familiar a la producción de granos para autoconsumo. Tienen como cultivo secundario el frijol (*Phaseolus vulgaris*) del cual siembran 3 variedades, Flor de mayo, Flor de junio y Pinto Saltillo (Saldivia, 2017). Sin embargo la cercanía de las zonas mineras a las zonas de cultivo representan un grave problema.

Bahmani *et al.* (2014) determinó que al exponer varios genotipos de frijol a diferentes concentraciones de Cd el metal induce estrés en la planta, afectando tanto su crecimiento como sus rasgos fisiológicos además de que el daño se relaciona con el nivel de exposición y acumulación del metal. Estos resultados demuestran la necesidad de estudiar e identificar plantas de consumo que

bioacumulen Cd como el frijol, pues es un riesgo evidente para los seres humanos (Ali *et al.*, 2013).

Otro importante descubrimiento de Bahmani *et al.* (2014) es que el Cd es inductor de estrés oxidativo. El estrés oxidativo es un desbalance entre la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la defensa antioxidante, encargada del control y remoción de dichas especies (Halliwell y Whiteman, 2004).

Algunas investigaciones han demostrado que como consecuencia del estrés por Cd a diferentes concentraciones plantas como *Solanum lycopersicum* (Nogueirol *et al.*, 2016), *Pteris vittata* (Balestri *et al.*, 2014), *Oriza sativa* (Roychoudhury *et al.*, 2012) y en *Hygrophila schulla* (Mandal *et al.*, 2015) responden produciendo elevadas cantidades de H₂O₂ lo que puede dañarlas.

Aunque el Cd no está directamente involucrado en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), puede dañar la cadena respiratoria, inhibir enzimas antioxidantes y desplazar otros iones en metaloproteínas, lo que desencadena reacciones de Fenton (Romero-Puertas *et al.*, 2019). Al alterarse el metabolismo celular las plantas activan sistemas de defensa antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, que trabajan en conjunto para controlar y proteger las células vegetales (Peralta, 2012).

Es por lo anterior que el presente trabajo, tiene como objetivo estudiar la relación que existe entre el estrés oxidativo ocasionado por la presencia del Cd y la bioacumulación del mismo en *Phaseolus vulgaris* variedad Pinto Saltillo.

2. Justificación

El Cd es un metal tóxico relacionado con enfermedades como lesiones hepáticas, pulmonares, óseas, renales, cáncer de pulmón o de próstata. (Londoño, 2016). Proviene principalmente de actividades mineras las cuales debido a su pobre regulación, han permitido su incorporación a la cadena trófica al depositarse en agua, suelos y plantas, aumentando su concentración al pasar el tiempo. (Pérez y Ascona, 2012; Covarrubias, 2016).

Se considera que las plantas son el principal medio de transporte del Cd hacia los seres humanos y animales por lo que se han realizado estudios con algunas que sean potencialmente bioacumuladoras a fin de evaluar su capacidad para almacenar el metal en sus tejidos y semillas (Chen *et al.*, 2019; Jasmine y Mukherji, 2019). Como resultado se encontró que el Cd afecta los procesos morfofisiológicos y bioquímicos, también puede inducir al estrés oxidativo (Ammar *et al.*, 2008, Ashraf *et al.*, 2015; Romero -Puertas *et al.*, 2019).

Especies vegetales de interés agrícola como el frijol (*Phaseolus vulgaris*) también sufren de estos daños al estar expuestas a metales como Cd. La importancia de este cultivo en México no se limita solo a la parte cultural al ser parte fundamental de la dieta de los mexicanos, sino que también entiende la parte económica al colocarse en el 8vo lugar del ranking mundial en producción (FAO, 2018; Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2021).

Por lo anterior se propone evaluar la capacidad de bioacumulación de Cd y su relación con el estrés oxidativo asociado al metal en *Phaseolus vulgaris* variedad Pinto Saltillo.

3. Antecedentes

3.1. El suelo

La formación del suelo se da a partir de la desintegración de rocas superficiales por acción del agua, viento y cambios de temperatura; su composición permite el desarrollo de organismos vegetales, animales, etc. (FAO, 2019). Es un cuerpo dinámico cuyos ciclos biogeoquímicos generan materia orgánica, la cual, junto con la biodiversidad aportan nutrientes y unen partículas minerales entre sí. Estas interacciones sinérgicas entre los microorganismos favorecen el crecimiento y desarrollo de las plantas (Fernández y Rodríguez, 2015).

Además, tiene otros roles que elevan su importancia como la producción de alimentos, capacidad de retención del agua, regular los gases de efecto invernadero, alojar gran biodiversidad, entre otros (Jiménez, 2017).

Las propiedades del suelo van modificándose por causas naturales o por actividades antropogénicas, éstas últimas, son las que en mayor medida provocan disminución en la calidad y rendimiento del suelo. Es por ello que constantemente se buscan tecnologías para recuperarlo y devolverlo lo más parecido posible a su estado natural (Navarro, 2014).

3.2. Situación del suelo en México

De acuerdo con SEMARNAT 2018, México es rico en biodiversidad, posee 87 % de los tipos de suelo existentes del planeta dando como resultado características muy particulares que lo definen tales como: topografía de origen volcánico, altitudes que van de los 0 a más de 5,600 msnm, cuatro de los cinco grandes climas del mundo y una vasta variedad de paisajes y rocas.

En México, la degradación del suelo ha afectado cerca del 50 % de la superficie del país principalmente derivado de actividades antropogénicas (Bolaños *et al.*, 2016). Ocupando el primer lugar la degradación química (34.04 millones de hectáreas, 18 % del territorio nacional), seguida por erosión hídrica (22.72 millones de hectáreas,

12 %), erosión eólica (18.12 millones de hectáreas, 10 %) y, al final, la degradación física (10.84 millones de hectáreas, 6 %) (SEMARNAT, 2015).

3.3. Metales pesados

De acuerdo con Reyes- Navarrete *et al.* (2010) los metales pesados son un grupo de metales o metaloides con toxicidad potencial. La contaminación por metales pesados se ha incrementado debido a actividades antropogénicas, las cuales generan residuos de estos metales aumentando los niveles en suelos y agua (Zhang *et al.*, 2012).

Dentro de estos elementos se pueden encontrar: aluminio (Al), bario (Ba), berilio (Be), cobalto (Co), cobre (Cu), estaño (Sn), hierro (Fe), manganeso (Mn), cadmio (Cd), mercurio (Hg), plomo (Pb), arsénico (As), cromo (Cr), molibdeno (Mo), níquel (Ni), plata (Ag), selenio (Se), talio (Tl), vanadio (Va), oro (Au) y zinc (Zn) (CONCON, 2009).

Poseen alta densidad (mayor a 4 gcm^{-3}), masa y peso atómico por encima de 20 son tóxicos en bajas concentraciones y al encontrarse en forma iónica o coloidal son solubles en el suelo. Son persistentes y no biodegradables por lo que permanecen en el suelo durante mucho tiempo en un rango de 1 a $100,000 \text{ mgkg}^{-1}$ (Rostami y Azhdarpoor, 2019).

Cuando existen concentraciones elevadas de dichos metales en el organismo de los seres vivos alteran sus procesos bioquímicos y fisiológicos ocasionando diversas patologías.

Se han establecido diversas normas para controlar y remediar la contaminación generada por estos contaminantes en suelos. Para Cd la Organización Mundial de la Salud (OMS) y autoridades ambientales y de salud como legislación del Codex alimentarius 193-1995 y Unión Europea (UE) 2017 establecieron niveles de 0.01 mgkg^{-1} para legumbres vegetales (Allevato *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2019). En México está la NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004, Que establece criterios para

determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio para remediarlo. Esta norma indica que para Cd las concentraciones de referencias totales (CRT) por tipo de suelo con se 37 mgkg⁻¹ para suelo de uso agrícola/residencial/comercial y 450 mgkg⁻¹ para suelo de uso industrial.

Concentraciones de mercurio, arsénico, plomo, cadmio, zinc, níquel y cromo se han encontrado en lechuga, repollo, calabaza, brócoli y papa (Singh *et al.*, 2010, Chen *et al.*, 2013).

Entre una de las causas de esta contaminación se encuentra el agua de riego contaminada (Fransisca *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015). Así mismo y como resultado de la bioacumulación se han encontrado metales en diferentes concentraciones en peces, carnes y leche, en ostras, mariscos y moluscos se han reportado valores entre 100 y 1000 µgkg⁻¹ (Li *et al.*, 2015).

La constante exposición del medio ambiente a los metales pesados y el exceso de estos resulta en la alteración molecular en todos los niveles de organización biológica, en plantas implica un peligro adicional si se acumulan e integran a la cadena trófica. Minimizar la entrada de estos contaminantes a la cadena alimentaria es una tarea imperativa para el desarrollo sostenible (Galante *et al.*, 2013, Pirzadah *et al.*, 2015).

3.4. Contaminación de suelo por cadmio

Los metales pesados se relacionan con la explotación de recursos no renovables del sector industrial, la industria agrícola y principalmente la explotación minera que se ha convertido en un problema debido a su poca regulación (Covarruvias, 2016). Los desechos que se generan en estos procesos son descargados directamente o arrastrados por escorrentías siendo depositados en los suelos (Fuentes *et al.*, 2010).

El cadmio es el séptimo metal más tóxico según la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR), es parte de la composición natural de algunas rocas y suelos asociado a otros metales como el zinc, plomo, cobre o elementos como: oxígeno (óxido de cadmio), cloro (cloruro de cadmio) o azufre (sulfato de cadmio, sulfuro de cadmio) siendo este el único mineral del cadmio a partir del cual se liberan al medio ambiente una cantidad cercana a 25,000 toneladas (Minaya, 2014). La mayor parte del cadmio se extrae durante la producción de otros metales como el zinc, plomo y cobre. El cadmio no se corroe fácilmente y tiene muchos usos, por ejemplo, en pilas, pigmentos, revestimientos metálicos y plásticos. (Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, 2016).

Cuando el cadmio entra en contacto con el medio ambiente puede cambiar de forma pero, las partículas de cadmio en el aire viajan largas distancias antes de caer a la tierra o al agua, algunas formas de cadmio se disuelven en el agua o adhieren fuertemente a partículas de tierra, plantas y animales absorben cadmio del medioambiente (Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, 2016).

La movilidad y biodisponibilidad del cadmio en agua y suelos depende de la forma química que este adopte, variando en función variables como el pH y la presencia de cationes y aniones orgánicos e inorgánicos que estén presentes en el suelo. (Cullen y Maldonado, 2013).

3.5. Toxicología del Cadmio

El cadmio puede acumularse en suelo y agua en plantas, sedimentos, animales y seres humanos ya sea por vía oral o inhalación (Cuadro 1).

Cuadro 1. Algunas vías de exposición de Cd.

Oral	Al beber agua o ingerir alimentos contaminados (hojas de vegetales, granos, cereales, frutas, vísceras animales y pescado) (Nava y Méndez, 2011).
Inhalación	En los centros de obtención y procesamiento de Cd, donde existe exposición directa a concentraciones superiores a 50 μgL^{-1} (Nava y Méndez, 2011).
Fumar	En cultivos de tabaco se han llegado a encontrar concentraciones de Cd. En sangre de fumadores pasivos entre 0.4 a 1.0 μgL^{-1} , mientras que en fumadores activos entre 1.4 a 4 μgL^{-1} (Navarro <i>et al.</i> , 2007; Bayona, 2009; Nava y Méndez 2011).

Cuando ocurre la exposición al metal este ingresa al cuerpo utilizando la sangre como medio de transporte concentrándose en el hígado y riñones provocando daños aún en concentraciones reducidas. Tiene inclinación por proteínas que contienen cisteína (metalotioneínas) causando daños en tejidos (Reyes *et al.*, 2016).

Es un metal de depósito, esto significa que se aloja en los órganos objetivos teniendo un tiempo de vida dentro del organismo de entre 10 y 30 años, esto sumando a una continua exposición genera un aumento en su concentración conforme pasa el tiempo (bioacumulación) (Pérez y Ascona, 2012).

Se pueden producir enfermedades agudas o crónicas como lesiones hepáticas, pulmonares, óseas, renales y cáncer de pulmón o de próstata (Londoño, 2016). Las lesiones renales consisten en daño del túbulo contorneado proximal con disfunción celular seguida de una acumulación de radicales libres y apoptosis, secundariamente se produce una desmineralización del hueso, en el hígado se acumulan las metalotioneínas produciendo inflamación y disfunción hepática. Además, sus niveles altos en sangre se han asociado con asma y altos niveles de

IgE (inmunoglobulina E alérgeno-específica total y específica) relacionados con las concentraciones de anticuerpos (Pérez y Ascona 2012, Park, 2016, Díaz y Arceo., 2018).

En cuadro 2 se observan los niveles que indica la EPA como efectos crónicos para la salud por exposición a As, Cd, Cr, y Pb.

Cuadro 2. Efectos crónicos en la salud por exposición en agua potable (EPA, 2007).

Elemento	MNMC ¹ (mgL ⁻¹)	NMC ² o TT ³	Efectos a la salud	Contaminación en agua potable
As	Ninguno	0.05	Lesiones en la piel, trastornos circulatorios, alto riesgo de cáncer	Erosión de depósitos naturales, aguas de escorrentías de huertos, aguas con residuos de la fabricación de vidrios y electrónicos.
Cd	0.005	0.005	Lesiones renales	Corrosión de tubos galvanizados, erosión de depósitos naturales, efluentes de refinerías de metales, líquidos de escorrentías de baterías usadas y de pinturas
Cr (total)	0.10	0.10	Dermatitis alérgica	Efluentes de fábricas de aceros y papel, erosión de depósitos naturales.
Plomo	0.00	Nivel de acción=0.015	Déficit de atención, retraso en desarrollo físico y mental en niños. Trastornos renales e hipertensión en adultos.	Corrosión de cañerías en el hogar, erosión de depósitos naturales

-
1. Meta de Nivel Máximo Contaminante (MNMC): Es el nivel de un contaminante en el agua potable por debajo del cual no se conocen o no se esperan riesgos para la salud. Permiten contar con un margen de seguridad y no son objetivos obligatorios de la Salud Pública.
 2. Nivel Máximo del Contaminante (NMC): Es el máximo nivel permitido de un contaminante en el agua potable. Los NMC se establecen tan próximos a los MNMC como sea posible, usando la mejor tecnología de tratamiento posible. Los NMC son normas de obligatorio cumplimiento.
 3. Técnica de Tratamiento (TT): Proceso obligatorio cuya finalidad es reducir el nivel de contaminante dado en el agua potable

Los hechos anteriores y algunos no enlistados aumentaron el interés de la ciencia del suelo y las plantas por conocer y controlar los mecanismos de acción, sí como los efectos que el metal produce en diferentes cultivos, pues ya se considera que la principal vía de exposición al Cd es a través de los alimentos (Chaney 2012). Existen diferentes estudios en plantas de interés agrícola en las que se ha reportado la presencia del metal. Un ejemplo es un estudio realizado en cultivares de arroz en China, las concentraciones de Cd halladas provocaban ablandamiento de los huesos e insuficiencia renal en los afectados (Li *et al.*, 2011).

Se han reportado que algunos de los síntomas generales de toxicidad por Cd; incluyen la reducción del crecimiento y la fotosíntesis (Per *et al.*, 2016; Rizwan *et al.*, 2016; Figlioli *et al.*, 2019), peroxidación de lípidos (Muradoglu *et al.*, 2015; Bahmani *et al.*, 2017), sobre acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (He *et al.*, 2015; Bahmani *et al.*, 2019a), y actividades de enzimas antioxidantes alteradas (Schutzendubel *et al.*, 2001; Bahmani *et al.*, 2019b).

Como resultado de investigaciones como el ejemplo anterior el Cd es reconocido por tender a acumularse e inhibir los procesos fisiológicos de las plantas provocando severos desequilibrios o la muerte de la planta y ello depende, entre otros factores, del tiempo de exposición, el contenido del metal y las adaptaciones específicas que desarrollan.

Chmielowska *et al.* (2018) sometió plántulas de soja a un tratamiento con Cd y reportó que a las 24 h las plántulas mostraron signos de pardeamiento de las raíces,

inhibición en su crecimiento y a un aumento significativo en la cantidad de células muertas, todo esto con la concentración más alta de Cd 25 mgL⁻¹.

Chang *et al.* (2018) encontraron exposición de La y Cd tanto en forma individual como combinada con efectos negativos sobre el crecimiento en maíz disminuyendo en un 15.3 %.

3.6. Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo

El término ERO (Especies reactivas de oxígeno) hace referencia a un grupo de moléculas que son producidas durante el metabolismo aeróbico fisiológico normal y contienen oxígeno con reactividad química diferente con una fuerte capacidad oxidante (Mittal *et al.*, 2014).

La producción de ERO ocurre en diferentes organelos celulares como: mitocondrias, cloroplastos, peroxisomas, retículo endoplásmico y en la membrana plasmática (Karuppanapandian *et al.*, 2011). También pueden formarse por enzimas como la NADPH oxidasa, la xantina oxidasa y el óxido nítrico sintetasa (NOS); asimismo pueden originarse por fuentes externas como los metales pesados, el alcohol, solventes industriales, la luz uv y ciertos medicamentos como el paracetamol (Phaniendra *et al.*, 2015; Tangvarasittichai, 2015).

El estrés oxidativo es el daño tóxico que provocan las especies químicas altamente reactivas que se producen la reducción del O₂⁻ y que pueden ser o no radicales libres (Halliwell, 2006). Esta reducción se da por varios pasos (Figura 1):

- i) En una primera reducción se producen radicales superóxido (O₂⁻) o hidroperóxido (HO₂)
- ii) El O₂⁻ se dismuta a H₂O₂ por la superóxido dismutasa o de manera espontánea por la pérdida de un electrón (Gechev y col., 2006)
- iii) El H₂O₂ puede transformarse al radical hidroxilo (·OH) por reacción Fenton, o bien, eliminado catalasas o mediante el ciclo ascorbato-glutatión (Blokhina y col., 2003; Rinalducci y col., 2008).

El oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$) es una ERO que no se relaciona con la transferencia de electrones (e^-), ya que es el primer estado excitado del O_2 , producido por fotoactivación (Triantaphylides y Havaux, 2009).

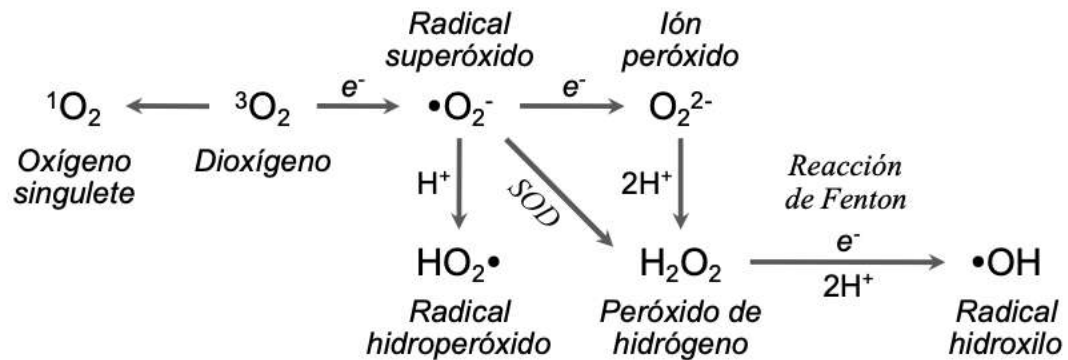


Figura 1. Producción de ERO durante la reducción de O_2 (Imlay, 2008; Gill y Tuteja 2010).

Como principal función las ERO actúan como moléculas mensajeras que regulan una gran variedad de diferentes procesos fisiológicos en organismos vivos y pueden actuar como defensa ante agentes externos (Mittal, 2014). Para ello es necesario que la producción de ERO se encuentren dentro de niveles compatibles con las funciones celulares normales, por lo que el organismo desarrolla mecanismos antioxidantes a fin de regular esta relación. Sin embargo existen casos como el estrés por metales pesados, donde la producción de ERO es mucho mayor y el sistema del defensa antioxidante disminuye, ocasionando un desbalance y a la vez una ruptura de la función celular (Halliwell y Whiteman, 2004).

3.7. Sistema de defensa antioxidante

El sistema de defensa incluye un grupo de enzimas importantes como catalasas (CAT por sus siglas en inglés) y peroxidasas (SOD por sus siglas en inglés), que catalizan la oxidación de varios sustratos donantes de electrones a través de la descomposición del H_2O_2 (Pandey *et al.*, 2017), trabajan en conjunto para controlar la sobreoxidación y mantienen a las células vegetales alejadas del daño oxidativo

mediante la eliminación de ERO (Thirupathi *et al.*, 2011, Hasanuzzaman *et al.*, 2012).

En sitios agrícolas donde el suelo está contaminado con Cd se crea una situación propicia para que las plantas produzcan niveles altos de ERO. Según Khan *et al.* (2016) cuando una planta se estresa por Cd se activa un mecanismo de protección a fin de controlar el exceso de ERO antes de que se dañe la estructura celular y se altere su metabolismo, pues la ERO al reaccionar con los componentes celulares en la planta, genera la ruptura de ácidos nucleicos y proteínas, la degradación de pigmentos, inactivación de enzimas y peroxidación lipídica.

El radical O_2^- es el más abundante, común a nivel celular y uno de los primeros radicales que se forman en la producción de ERO, es altamente reactivo y ataca los lípidos de la membrana, las proteínas y el ADN así que es necesario eliminarlo (Phaniendra *et al.*, 2015).

Uno de los oxidantes enzimáticos que regula las cantidades de O_2^- y H_2O_2 al disminuir la formación de radicales OH hacia la membrana, la proteína y el ADN es la enzima superóxido dismutasa. (SOD.) Funciona como la primera línea de defensa y puede convertir y/o eliminar el radical O_2^- en OH (Muradoglu *et al.*, 2015). Como producto cataliza la dismutación de radical O_2^- se genera H_2O_2 y que aunque es menos reactivo sigue siendo tóxico por lo que debe eliminarse, esto se logra con la colaboración entre la enzima SOD y la enzima CAT, ambas trabajan en conjunto para regular el nivel intracelular de H_2O_2 .

La catalasa (CAT) es una enzima tetramérica dependiente del grupo hemo (es una hemo proteína) presente en los peroxisomas y en las mitocondrias, que se encarga de catalizar la descomposición del H_2O_2 en H_2O y O_2 (Halliwell, 2006, Gill y Tuteja, 2010).

La fenilalanina amonio liasa (PAL por sus siglas en inglés) cataliza el primer paso en la vía biosintética del fenilpropanoide a través de la desaminación de la fenilalanina en ácido transcinámico, un precursor de las vías biosintéticas de la

lignina y los flavonoides (Jun *et al.*, 2018, Gho *et al.*, 2020). Es importante en la síntesis de metabolitos secundarios y el proceso de resistencia al estrés (Zhen y DeGang, 2017).

Las enzimas pueden utilizarse como indicadores de contaminación al dar una respuesta confiable una vez que la planta quede expuesta al contaminante (Ji *et al.*, 2018). En la planta aumenta el coeficiente metabólico con el incremento de la contaminación, mientras que la actividad de las enzimas deshidrogenasa y arilsulfatasa decrece (Friedlová, 2010). Los pigmentos fotosintéticos también pueden ser considerados como un biomarcador sensible a la contaminación y al estrés ambiental (Sumanta *et al.*, 2014).

3.8. Biorremediación y bioacumulación

La biorremediación comprende cualquier proceso que emplee organismos vivos como microorganismos, plantas y hongos, los cuales generan agentes o compuestos que posteriormente son utilizados para tratar un suelo contaminado (Jasmin *et al.*, 2019). También puede definirse como el empleo de ciertas propiedades biológicas que poseen microorganismos y plantas volviendo inocuos a los contaminantes (Zaouboulis *et al.*, 2011). Otra definición muy similar afirma que es la reducción de diversos compuestos tóxicos a partir de procesos bioquímicos realizados por las plantas y microorganismos asociados a ellas (Li *et al.*, 2015).

Sin embargo el éxito de la remediación dependerá de diversos factores económicos, físicos y técnicos, pues para que una técnica de remediación se aplique a un sitio contaminado deben de realizarse con anticipación estudios que determinen la viabilidad del tratamiento en dicho lugar (Kuppusamy *et al.*, 2017).

Como uno de los medios de transporte de los metales hacia los seres humanos y animales es a través de plantas se han realizado estudios que evalúan la capacidad de diferentes especies para bioacumular el metal en sus tejidos y semillas con el fin

de emplearlas en remediación de suelos contaminados (Chen *et al.*, 2019; Jasmine y Mukherji, 2019).

Se conocen alrededor de 400 especies de plantas bioacumuladoras, por otra parte en el Cuadro 3 se muestran algunos metales y que familias y géneros pueden biocumularlos.

Cuadro 3. Ejemplo de familias y géneros de plantas bioacumuladoras de metales pesados (Ali *et al.*, 2013).

Elemento	No. Taxas	Familias principales	Géneros principales
Ni	317	Violaceae	<i>Hybanthus</i>
		Flacourtiaceae	<i>Homalium</i>
		Euphorbiaceae	<i>Phynthus</i>
		Brassicaceae	<i>Alyssum L.</i>
Pb	14	Poaceae	<i>Arrhenatherum</i>
		Brassicaceae	<i>Thlaspi, Brassica</i>
		Fabaceae	<i>Sesbania</i>
		Apocynaceae	<i>Hemidesmus</i>
Co	28	Plantaginaceae	<i>Plantago</i>
		Lamiaceae	<i>Haumaniastrum</i>
		Scrophulariaceae	<i>Crotalaria</i>
		Asteraceae	
Cd	4	Fabaceae	
		Brassicaceae	<i>Thlaspi y Arabidopsis</i>

Asteraceae

Bidens

Fabaceae

Para que una planta pueda ser definida como bioacumuladora debe poder almacenar al menos $100 \mu\text{g g}^{-1}$ de planta (0.01 % peso seco) de Cd y As; $1000 \mu\text{g g}^{-1}$ de planta (0.1 % peso seco) de Co, Cu, Cr, Ni y Pb; y $10\,000 \mu\text{g g}^{-1}$ (1.0 % peso seco) de Mn (Li *et al.*, 2015; Padmavathiamma y Li, 2007; Paz *et al.*, 2014).

La bioacumulación del cadmio en la planta dependerá principalmente de su capacidad de adaptación al estrés basándose en dos mecanismos principales; algunas optan por evitar y/o regular la entrada del metal y el transporte del mismo mientras que otras toleran determinadas concentraciones de Cd, a través de su detoxificación, mediante quelación en orgánulos intracelulares (Clemens, 2006).

Los mecanismos de tolerancia varían entre las distintas especies de plantas y están determinados por el tipo de metal, eficiencia de absorción, traslocación y secuestro. De acuerdo a Navarro (2007) existen 3 fases por el cual las plantas incorporan y acumulan metales pesados las cuales son:

- Fase I: A través de las raíces el Cd entra a la planta principalmente en forma de Cd^{2+} , pues por lo general sus iones quelatos no se encuentran disponibles para la absorción por las raíces. El metal se transporta al interior de la célula mediante flujo masivo o por intercambio catiónico entrando en el primer tejido que captura los iones las células epidérmicas, y dentro de ella, los pelos radicales son la zona más activa que absorbe los iones del suelo facilitando la absorción de Cd^{2+} .
- Para explicar la translocación de Cd^{2+} Song y Wang (2017) proponen tres diferentes vías de entrada de Cd en la raíz.

Primera vía: Dentro de la membrana plasmática en las células epidérmicas de la raíz, el CO_2 (ac) se disocia en H^+ y HCO_3^- , a través de la respiración de la planta. El H^+ se intercambia con el Cd^{2+} del suelo y el metal se adsorbe en la superficie de las células epidérmicas de la raíz. La adsorción es rápida, no requiere de energía y es la etapa precedente a la posterior absorción de Cd^{2+} en la epidermis a través de la vía del apoplasto.

Segunda vía: Se asume que las plantas no disponen de mecanismos de entrada específicos para el Cd al ser un elemento no esencial. Por lo que ingresa a las células vegetales utilizando los transportadores de metales esenciales Fe^{2+} , Zn^{2+} y Ca^{2+} . Al con las proteínas transportadoras, el Cd entra en la capa de epidermis de la raíz, mediante la vía simplástica.

Tercera vía: Las raíces secretan compuestos de baja masa molecular, como los ácidos mugineicos (MA), que forman complejos con el Cd^{2+} para aumentar la disponibilidad de iones en el suelo de la rizosfera. Por tanto, el Cd^{2+} ingresa a la capa de la epidermis de la raíz a través de las proteínas tipo YSL en forma de quelatos.

- Fase II: El movimiento de Cd^{2+} desde la raíz hacia el tallo es controlado en tres procesos: el secuestro de metales dentro de las células de la raíz; el transporte hacia la estela y la liberación del metal al xilema (Lux *et al.*, 2010). El secuestro o acomplejación ocurre mediante la unión a ligandos específicos. Las plantas producen quelantes en los ácidos orgánicos (ácidos cítrico, oxálico y málico), algunos aminoácidos (histidina y cisteína) y dos clases de péptidos: fitoquelatinas y metaloteínas.

Las fitoquelatinas y otros tioles son los quelantes principales en el secuestro de Cd^{2+} en la raíz (Nocito *et al.*, 2011). Las fitoquelatinas son ligandos de alta afinidad que tienen como sustrato al glutatión. Su constitución se basa en 3 aminoácidos: ácido glutámico, cisteína y glicina, unidos por enlaces

peptídicos. Las metalotioneinas son polipéptidos de unos 70-75 aminoácidos con alto contenido en cisteína, puede formar complejos con cationes mediante grupos sulfidrilo. Tienen una marcada afinidad por las formas iónicas de Zn, Cd, Hg y Cu.

- Fase III: Por la compartimentalización y detoxificación, el complejo ligando-metal queda retenido en la vacuola.
- Para ejemplificar como ocurre este proceso de absorción y acumulación en la Figura 2 se puede apreciar la respuesta de una planta ante la presencia de metales pesados.

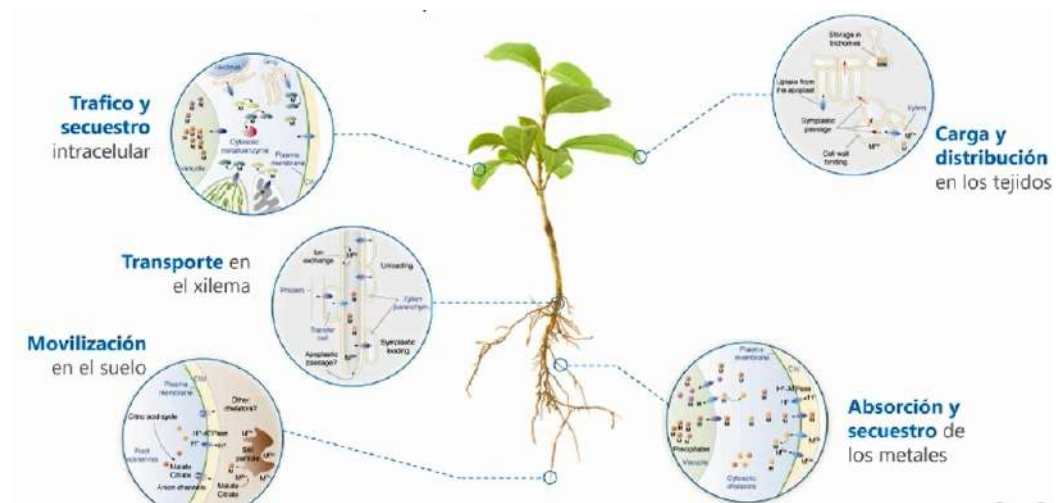


Figura 2. Respuesta de las plantas ante la presencia de metales pesados en suelo (Portalfruticola, 2019).

De acuerdo a Al-Hasan *et al.* (2017) otros de los mecanismos de adaptación que tienen las plantas son:

- Unión de metales a la pared celular de las raíces.

- Activación de un transporte reducido a través de la membrana interna de las células.
- Entrada o salida activa al interior celular.
- Compartimentación dentro de las vacuolas.
- Quelación a través de la unión del metal con complejos orgánicos, inorgánicos y con proteínas específicas como las fitoquelatinas o metalotioneinas.

3.8. *Phaseolus vulgaris*

Diversas especies vegetales han sido reportadas con posibilidades para acumulación de metales tóxicos en sus tejidos, inclusive algunas de interés agrícola como el frijol. Este cultivo en específico tiende a acumular cationes tóxicos en raíces, no pudiendo detectarse en el fruto agrícola (Portuondo, 2011).

En algunos estudios se ha demostrado que *Galega orientalis* (Lindström *et al.*, 2013) y el altramuz (*Lupinus albus*) tienen capacidad de acumular Zn, Cd Cu y Pb al modificar la química rizosférica en el suelo (Martínez *et al.*, 2010). *Lupinus luteus* también se ha logrado acumular de hasta 806 mg kg⁻¹ de Zn, 150 mg kg⁻¹ de Cu, 4.8 mg kg⁻¹ de Cd, y 80 mg kg⁻¹ de Pb en raíces de la planta (Dary *et al.*, 2010).

Las características químicas pueden limitar el desarrollo de las plantas (pH, salinidad, contenido de nutrientes y la deficiencia de nitrógeno), ante esta situación las leguminosas (*Fabaceae*) han desarrollado estrategias para satisfacer su requerimiento nutricional, esta característica la vuelve potencialmente bioacumuladora (Noguez, 2017).

El frijol es parte importante de la dieta de los mexicanos y de su economía desde tiempos prehispánicos, formando parte de la cultura gastronómica de México, existe

una gran variación en su hábito de crecimiento y se pueden consumir todas sus partes: flores, semillas y ejotes; ya sean tiernas o maduras (FAO, 2018).

Actualmente se conocen más de 150 variedades del frijol, de las cuales sólo una tercera parte se encuentran en territorio mexicano; por ejemplo el frijol blanco (alubia), negro, flor de mayo, morado, pinto, canario, y ayocote (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2019).

México cosecha el 4 % del frijol colocándose en el 8vo lugar del ranking mundial. Para su importación depende de los niveles de cosecha interna y del precio en el mercado, especialmente de lo que se registra en Estados Unidos al ser el principal cliente comercial, seguido de países como Perú, El Salvador, Guatemala e Italia. Tan solo en 2020 las importaciones alcanzaron 142 mil 601 ton, mientras que las exportaciones fueron de 46 mil 470 ton (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2021).

En el año agrícola 2018, la producción de frijol creció a una tasa anual de 1.0 %, para ubicarse en 1.196 millones de ton : 28.2 % (337 mil ton) se cosechó en el ciclo O-I, y 71.8 % (859 mil ton) en el ciclo P-V. La producción del ciclo O-I creció 11.3 % con respecto al ciclo homólogo previo, mientras que la del ciclo P- V disminuyó 2.5 % (SIAP-SAGARPA, 2019).

Es una planta herbácea perteneciente al género: *Phaseolus*, especie *Phaseolus vulgaris* L., asignada por Linneo en 1753, a la tribu Phaseoleae y familia *fabaceae* (Cuadro 4). De tallo delgado y débil, cuadrangular, algunas veces con rayas púrpura, hojas trifoliadas, ápice acuminado con laterales más o menos tubulosos y estandarte redondeado. Se puede encontrar en todo el mundo especialmente en Centroamérica y Sudamérica (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2021).

Cuadro 4. Taxonomía del frijol

Reino	Plantae
División	Mafnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Fabales
Familia	Fabacae
Género	<i>Phaseolus</i>
Especie	<i>Phaseolus vulgaris</i>

En el campo experimental Saltillo se ha trabajado en las elección de variedades mejoradas de frijol como alternativa económica viable para la producción de temporal. Como resultado se identificó la variedad Pinto Saltillo, la cual ha mostrado adaptación en varios estados del Altiplano Semiárido de México (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, 2006).

Frijol Pinto Saltillo proviene de una cruce entre las variedades Hidalgo 77////MAM 30///F1 (Michoacán 91- A/BAT 76)//F1(BAT 93/Ecuador 299), con la finalidad de incorporar resistencia a enfermedades en germoplasma de frijol mexicano y obtener variedades resistentes a enfermedades como: Antracnosis, roya, tizón común, tizón de halo, pudriciones de la raíz y que sea tolerante a sequía (Sánchez, 2001). Algunas de sus características se presentan en el cuadro 5.

Cuadro 5. Cuadro 5. Características agronómicas del Frijol Pinto Saltillo (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias ,2006).

Altura	32 cm
--------	-------

Hábito de crecimiento	Guía
Floración	62-70 días
Floración en riego	48-59 días
Madurez fisiológica	87-115 días
Madurez fisiológica en riego	87-100 días
Tipo de grano	Pinto
Color	Crema claro con pintas café claro
Tamaño de grano	Mediano
Otros	Altamente resistente a la oxidación

El crecimiento y los rasgos fisiológicos de los genotipos del frijol pueden afectarse por un tratamiento de cadmio a corto plazo (Bahmani *et al.*, 2014). Por tanto, es de gran interés estudiar la respuesta de diferentes genotipos de frijol a la toxicidad del Cd.

Bahmani *et al.*, 2020 estudiaron la ocurrencia de variación genotípica para la tolerancia al cadmio en 3 genotipos de frijol (Emerson, Taylor y G-11867) y concluyeron que a niveles bajos de acumulación de Cd y estrés oxidativo existe mayor tolerancia así como a menores efectos sobre las hormonas vegetales y el contenido de clorofila.

Ramírez *et al.* (2018) realizaron estudios con hierba mora (*S. nigrum L.*) y reportaron que la acumulación de cadmio en los distintos tejidos de la planta aumentó linealmente respecto al incremento de la concentración de cadmio. La longitud del tallo y la raíz también presentaron una correlación lineal, concluyeron que este comportamiento es debido a un equilibrio entre la parte aérea y la raíz, incidiendo en el área de exploración y absorción de cadmio por la planta.

Asimismo, el Cd afecta los procesos morfofisiológicos y bioquímicos de las plantas, como la germinación, el crecimiento y la relación raíz / brote (Ashraf *et al.*, 2015) resultando en la disminución de la producción del cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris*).

4. Hipótesis

Phaseolus vulgaris variedad Pinto Saltillo bioacumulará cadmio en distintas partes vegetales reduciendo la concentración del metal en el suelo y su efectividad se verá relacionada con el aumento de estrés oxidativo debido a una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno al aumentar la concentración del metal.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Evaluar la capacidad de bioacumulación de Cd y su relación con el estrés oxidativo asociado al metal en *Phaseolus vulgaris* variedad Pinto Saltillo.

5.2. Objetivo específico

1. Analizar el efecto de cadmio presente en un suelo contaminado en el desarrollo de *P. vulgaris* variedad Pinto Saltillo.
2. Determinar la capacidad de *P. vulgaris* variedad Pinto Saltillo como planta bioacumuladora de cadmio.
3. Demostrar la relación entre la actividad enzimática y el estrés oxidativo en *P. vulgaris* variedad Pinto Saltillo expuesto a cadmio.
4. Analizar la relación entre la fenología, bioacumulación y el estrés oxidativo de *P. vulgaris* variedad Pinto Saltillo expuesto a cadmio.

6. Metodología

6.1 Caracterización fisicoquímica de suelos

6.1.1. Obtención de suelo

En la localidad de Maconí, Cadereyta de Montes, Querétaro se realizó un muestreo en zigzag de una parcela de 60 m de largo y 10 m de ancho a una profundidad de 30 cm (Figura 3) de la cual se procedió a conformar una muestra compuesta para su posterior uso.

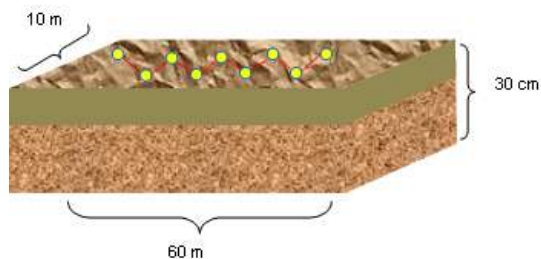


Figura 3. Representación esquemática del sitio donde se obtuvo el suelo de Maconí con sus respectivos puntos de recolección.

6.1.2. Análisis fisicoquímico del suelo

El suelo se caracterizó según la NOM-021-SEMARNAT-2000 que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. Los análisis fisicoquímicos seleccionados fueron: textura, densidad real y aparente, conductividad eléctrica, materia orgánica y pH, capacidad de campo y punto de marchitez permanente.

6.2. Determinación de la concentración de Cd en suelo mediante absorción atómica por la técnica de flama

6.2.1. Digestión de las muestras de suelo

Por triplicado se realizó la digestión de la muestra de suelo siguiendo lo descrito por el método 3051 de la EPA: Digestión ácida de lodos, sedimentos, suelos y aceites asistido por microondas, para posterior análisis por espectrometría de masas. La

muestra de suelo fué molida, pasada por un tamiz de 2 mm, depositada en bolsa debidamente rotulada y almacenada en un sitio libre de humedad.

De la muestra almacenada se pesó 0.5 g en un tubo equipado con un mecanismo de alivio de presión controlado, se adicionó 5 mL de HNO₃ J.T. Baker concentrado y posteriormente se trasladaron los tubos a un horno de microondas Anton Par (Figura 4), para una digestión de 3 etapas. En la primera etapa la presión se elevó por 10 min, en la segunda se mantuvo constante (300 psi) durante 10 min y finalmente la tercera constó de un enfriamiento de 5 min.



Figura 4. Horno de microondas Anton Par utilizado para la digestión.

Posteriormente se filtró con papel Whatman No. 40 y se aforó a 25 mL con agua destilada para transferirlas a botellas debidamente rotuladas donde se almacenó para posterior análisis.

6.2.2. Determinación de Cd en suelo

La determinación se realizó por triplicado mediante espectroscopia de absorción atómica por la técnica de flama. Para ello se realizó una curva de calibración a partir de estándares establecidos para Cd y se empleó un control de agua destilada con

HNO₃ y un estándar de Cd (1000 µg mL⁻¹) HIGH-PURITY STANDARDS acreditado por la SO/IEC 17025 Guide 34.

6.3. Bioensayos

Las semillas de frijol variedad pinto Saltillo obtenidas del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) se sembraron en el suelo que se colectó de Maconí y en arena de río, bajo condiciones controladas en invernadero (Figura 5).



Figura 5. Macetas de *P. vulgaris* sembradas en arena de río y suelo de Maconí.

6.4. Prueba de germinación

De acuerdo con la Asociación Internacional de Ensayos de Semillas (2016) con modificaciones para esta prueba se probó como medio germinativo los siguientes sustratos y se realizó por duplicado.

Arena: 10 semillas se sembraron en almácigos con arena húmeda a 1 cm de altura, para garantizar aeración.

En papel: En una caja de Petri se colocó una cama de papel húmedo con 10 semillas a 2 cm de distancia entre sí y se cubrió con papel aluminio.

Se depositó en cámara de crecimiento Barnstead Lab-Line con humedad controlada ambos ensayos. Al cabo de 6 días se determinó el porcentaje de germinación con la fórmula propuesta por Islam *et al.*, 2012.

$$PG = \frac{NSR}{NSG} * 100 \quad (1)$$

Donde

NSR: Número de semillas con emergencia de radícula

NSG: Número de semillas colocadas a germinar

6.5. Tratamiento con Cd en arena como sustrato y suelo proveniente de Maconí, Cadereyta de Montes

Se empleó un diseño experimental completamente al azar con 6 plantas como unidad experimental y 3 repeticiones.

En las macetas con arena se aplicó de forma separada 2 tratamientos con Cd a partir de la sal CdCl₂ mostrados en el Cuadro 6, la selección de las concentraciones de las soluciones sintéticas metálicas utilizadas para el dopaje del suelo se establecieron con base a la NOM-147- SEMARNAT/SSA1-2004, para la remediación de suelos agrícolas. La concentración empleada en el tratamiento 3 fué la encontrada después del análisis en espectrofotómetro de flama al suelo colectado para determinar su contenido de Cd. Es decir no se le añadió solución sintética.

Cuadro 6. Diseño experimental

Concentración de Cd en mgkg ⁻¹ (solución sintética)
Identificación

Testigo	0
Tratamiento 1	70
Tratamiento 2	100
Tratamiento 3	102.1*

*Concentración presente en el suelo de Maconí posterior al análisis en espectroscopía de absorción atómica de flama.

Donde

- Control: Planta + Arena
- Tratamiento 1 Planta + Arena con una concentración de Cd de 70 mgkg^{-1}
- Tratamiento 2: Planta + Arena con una concentración de Cd 100 mgkg^{-1}
- Tratamiento 3: Planta + Suelo de Maconí cocentración 102.1 mgkg^{-1}

Se realizaron muestreos de parte vegetal y de suelo a los 20, 60, 90 días y al final del experimento para análisis posteriores.

6.5.1. Cultivo de semilla de frijol

Se sembraron en macetas de 20 x 20 utilizando dos sustratos, el primero fue el suelo colectado de Maconí y para el segundo sustrato se empleó arena de río, por cada maceta se depositó una base de 3 cm de tezontle más 1.2 kg de suelo. La semilla se germinó en almácigos con arena. A los 14 días se realizó el trasplante a macetas dejando 2 plantas por maceta como unidad experimental y se le añadieron las concentraciones de Cd establecidas por cada tratamiento.

Con base a lo descrito por Petillo *et al.*, 2012 y con algunas modificaciones se calculó la capacidad de campo de la arena para determinar el riego, 500 g de arena se colocaron en un vaso de precipitados y se saturó con agua. El vaso se cubrió con un vidrio de reloj y para dejarlo reposar 24 h, cuando se observó exceso de

agua se procedió a pesar la muestra. Posteriormente fue secado en horno a 100 °C de 24-48 h cuidando que no se quemara el suelo.

Una vez seco el suelo se pesó y calculó la capacidad de campo con la siguiente fórmula:

$$HP \% CC = \frac{(\text{Peso Fresco a CC} - \text{Peso Suelo Seco})}{\text{Peso Suelo Seco}} * 100 \quad (2)$$

También se calculó el punto de marchitez permanente con la fórmula de Silva *et al.* (1988):

$$PMP \% = -5 + 0.74 CC\% \quad (3)$$

Con los datos obtenidos se crecieron las plantas con riego cada 2 días adicionando solución Hoagland compuesta por 17 g de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 2.5 mL de KNO_3 , 2.5 mL de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 1.3 g de MgSO_4 , 1 mL de CuSO_4 , 1 mL de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.03 g de ZnSO_4 , 0.115 g de H_3BO_3 , 1 mL de $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24}$ y 50 mL de $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_6\text{FeNa}$ 1 vez por semana.

6.6. Cuantificación de Cd en planta y análisis de morfología vegetal

6.6.1. Medición de tallo y hojas

Se tomaron aleatoriamente 2 plántulas completas y libres de residuos de sustrato, para extenderlos sobre una superficie plana y medir la longitud del tallo y alturas.

6.6.2. Determinación de Cd en tejido vegetal

Se analizaron los diferentes órganos de la planta (raíz al final del ciclo, tallo y hoja durante todos los muestreos) siguiendo los pasos del punto 6.2.1. La digestión se realizó por triplicado.

6.6.3 Factor de bioacumulación

Así mismo se calculó el factor de bioacumulación (FBC) que se define como la relación de la cantidad de metal en la planta (raíz, tallo u hoja) a la cantidad en el suelo (mgkg^{-1} peso seco) (Bi *et al.*, 2018).

$$FBC = \frac{C_{\text{parte aérea de la planta}}}{C_{\text{del suelo}}} \quad (4)$$

6.7. Actividad enzimática

Para obtener el extracto enzimático que se utilizó en todas las determinaciones se pesó 0.5 g de muestra vegetal y homogeneizó en un mortero con 1 mL de búfer de extracción a 4 °C. Posteriormente, se colocó la muestra homogeneizada en un tubo de ensayo con 1 mL de búfer de extracción, se agitó en vortex y se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min a 4 °C. Se separó el sobrenadante (extracto enzimático) y almacenó a 4 °C.

6.7.1. Fenilalanina-amonio liasa

La actividad Fenilalanina-amonio liasa (PAL, por sus siglas en inglés) se determinó de acuerdo a lo reportado por Toscano *et al.* (2018) basado en la cuantificación de ácido cinámico formado a partir de la catálisis de L-fenilalanina, usando 50 mg de muestra vegetal (Figura 6) que se homogeneizó en un mortero con 1 mL de búfer de extracción a 4 °C, el homogeneizado se colocó en un tubo de ensayo con 1 mL de búfer de extracción y se agitó en vortex durante 2 min. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min a 4 °C y el sobrenadante fue utilizado para ensayos enzimáticos.

La actividad PAL se evaluó en 2.3 mL de buffer de reacción compuesto de 0.1 M de tampón de borato de sodio (pH 8.8), 10 mM de L-fenilalanina y 0.2 mL extracto

enzimático. La muestra se incubó a 40°C y la reacción se detuvo después de 1 h por adición de 0.5 mL de HCl 1 N, se dejó reposar 10 min. Por último, se midió la absorbancia a 290 nm. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que causa la disminución de la absorbancia de 1 μmolmin^{-1} .



Figura 6. Muestras vegetales utilizadas para pruebas enzimáticas.

Para los cálculos de PAL utilizó la siguiente fórmula

$$\frac{U}{mL} = \frac{(x)(Vt)(1000)}{(PM)(t)(Ve)} \quad (5)$$

Donde

x = concentración de ácido cinámico

Ve = volumen del extracto

Vt = volumen total del ensayo

PM = peso molecular del producto (ácido cinámico) t = tiempo de la reacción

1000 = factor de conversión de unidades

6.7.2. Catalasa

La actividad de catalasa (CAT) se determinó de acuerdo a lo reportado por Afiyanti & Chen (2014) con modificaciones basadas por la cuantificación de peróxido de hidrógeno catalizado, 50 mg de muestra vegetal que se homogeneizaron en un mortero con 1 mL de búfer de extracción a 4 °C, el homogeneizado se colocó en un tubo de ensayo con 1 mL de búfer de extracción y se agitó en vortex durante 2 min. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min a 4 °C y el sobrenadante fue utilizado para ensayos enzimáticos.

La actividad CAT se evaluó en 2 mL de buffer de reacción compuesto de 50 mM de fosfato de potasio (pH 8), 0.2 mL de solución de H₂O₂ y 0.1 mL extracto enzimático. Se midió el cambio de absorbancia a 240 nm durante 6 min (una lectura cada min). Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima (CAT) que cataliza (consume) 1 μmolmin⁻¹ de H₂O₂, bajo condiciones del ensayo.

Para los cálculos de CAT se utilizó la siguiente fórmula

$$\frac{U}{mL} = \frac{(A_{240nm})(Vt)(FD)}{(Ve)(L)} \quad (6)$$

Donde

ΔA_{240nm} = cambio de absorbancia por min

Ve = volumen del extracto

Vt = volumen total del ensayo

FD = factor de dilución

ε = coeficiente de extinción molar de peróxido de hidrógeno (0.0394 Mm⁻¹cm⁻¹)

L = longitud de la celda

6.7.3. Superóxido dismutasa

La actividad superóxido dismutasa (SOD) se determinó basado en la inhibición de la reducción de nitroazul de tetrazolio, usando 50 mg de muestra vegetal que se homogeneizó en un mortero con 1 mL de búfer de extracción a 4 °C, el homogeneizado se colocó en un tubo de ensayo con 1 mL de búfer de extracción y se agitó en vortex durante 2 min. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min a 4 °C y el sobrenadante fue utilizado para ensayos enzimáticos.

La actividad CAT se evaluó en 21.5 mL de buffer de reacción compuesto de 0.05 M de fosfato de potasio (pH 7.8), 0.3 mL de EDTA-Na₂ 0.1 mM, 0.3 mL de metionina 0.13 M, 0.3 mL de NBT 0.75 mM, 0.3 mL de riboflavina, 0.05 mL del extracto enzimático y 0.25 mL de agua destilada. Se mezclaron los tubos por inversión y se expusieron a luz solar durante 20 min (desarrollo de color) (Figura 7a y 7b). Posteriormente se midió la absorbancia a 560 nm. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima (CAT) que cataliza (consume) 1 μmolmin^{-1} de H₂O₂, bajo condiciones del ensayo.

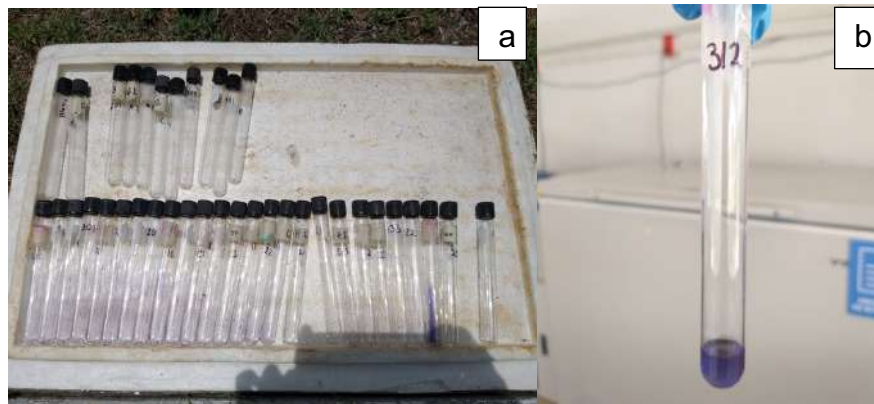


Figura 7. a)Muestras expuestas a luz solar b)Cambio en la coloración

Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima (SOD) que inhibe el 50% de la reducción de NBT por superóxidos generados, bajo las condiciones del ensayo. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima (SOD) que realiza el 50 % de la reducción de radicales superóxido, bajo las condiciones del ensayo.

Para los calculos de SOD se utilizaron las siguientes fórmulas

$$\% \text{ de Inhibición} = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100 \quad (7)$$

Donde

$A = A_{\lambda 560\text{nm}}$ de la muestra de reacción

$B = A_{\lambda 560\text{nm}}$ del blanco de reacción

$$x = e^{\frac{y-55.836}{8.6026}} \quad (8)$$

Se sustituyó el valor de % inhibición (y) obtenido de la ecuación (7) en la ecuación (8) para obtener la actividad de SOD (x).

6.7.4. Determinación de proteína

La proteína se determinó por la cuantificación del complejo azul brillante de Coomassie G-250 con la proteína de la muestra de acuerdo al método reportado por Bradford (1976), se mezcló 50 μL de extracto enzimático con 1.5 mL de reactivo Bradford y se agitaron en vórtex 30 seg. Seguidamente se dejaron reposar 20 min en oscuridad y finalmente se midió la absorbancia a 595 nm.

$$x = \frac{y-0.0085}{0.5066} \quad (9)$$

Donde

$y = A_{\lambda 595\text{nm}}$

$x = \text{Concentración de albúmina (mgmL}^{-1}\text{)}$

6.8. Análisis estadístico

El análisis de los datos obtenidos se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía por Tukey con un nivel de significancia de $p < 0.05$ para determinar diferencias significativas utilizando el paquete estadístico Minitab 2016.

7. Resultados y discusión

7.1. Caracterización fisicoquímica de los suelos

Los resultados se interpretaron según los lineamientos de la NOM-021-SEMARNAT-2000. Los resultados del análisis textural del suelo se pueden observar en el Cuadro 8, se encontró un contenido de arena del 81 % para el suelo de Maconí y de 91 % para la arena de río, siendo esta partícula predominante en ambos suelos. El contenido de limo encontrado en el suelo de Maconí fue de 18 % y de 5.8 % en la arena de río. El contenido de arcilla fue menor del 5 %, para el suelo de Maconí se obtuvo 1 % y para arena de río 3.2 %. Estos datos indican que cada una de los suelos corresponden con la clasificación textural de suelos franco arenoso y arenoso respectivamente.

Para los valores de conductividad eléctrica (CE) se observaron en ambos suelos efectos despreciables de salinidad, no obstante la conductividad del suelo proveniente de Maconí es mayor con 0.207 dSm^{-1} a la encontrada en la arena de río con 0.014 dSm^{-1} . Montes (2016) reportó un aumento de CE debido a la a la influencia de los metales pesados y otros minerales presentes entre una muestra de un jal minero 0.225 dSm^{-1} y una de referencia 0.048 dSm^{-1} .

El pH es el principal factor que influye en la movilización de metales debido las reacciones de hidrolisis por parte de los cationes, lo que aumenta la solubilidad y en consecuencia aumenta la movilidad del metal. El suelo de Maconí tiene un pH de 7.7 lo que se considera medianamente alcalino. Este resultado es similar a lo reportado por Santos-Jallath *et al.* (2013) quienes encontraron pH alcalinos para 4 sitios muestreados en Maconí. Por otra parte la arena de río arrojó un valor de 8.5 que de acuerdo a la normatividad se considera fuertemente alcalino, por lo que en ambos suelos los minerales son poco solubles y la absorción de iones metálicos al suelo es más fuertes debido a la formación de hidróxidos metálicos (Daldoul, 2015).

Los porcentajes de materia orgánica encontrados en ambos suelos se clasifican como de clase baja, en el suelo de Maconí fue de 1.306 % y la arena con 0.939 %. Conocer la cantidad de materia orgánica permite conocer las interacciones que

ocurren en el suelo que pueden afectar la absorción de metales en la planta (como la formación de complejos con los iones) y si el suelo cuenta con la cantidad suficiente de nutrientes para aportarle a la planta (Li, 2007).

Los resultados de densidad real fueron para el suelo de Maconí de 2.702 gml^{-1} y para la arena de río de 2.502 gml^{-1} (Cuadro 8). Ambos suelos tienen un alto contenido de minerales pues según la USDA (2011) el suelo debe tener 2.65 gml^{-1} además, los valores encontrados son superiores a los reportados por Rosquete, (2019) quién reportó un valor de 2.41 gml^{-1} de un jale en Zimapán, Hidalgo.

Previo al inicio del experimento se realizó cuantificación de Cd mediante espectrofotometría de absorción atómica de flama para determinar la concentración inicial de Cd en el suelo de Maconí, como resultado se encontró que este suelo tiene 102.1 mg de Cd.

Cuadro 7. Propiedades físicas de los suelos utilizados en el experimento.

Propiedad	Arena de río	Suelo de Maconí
C.E. (dsm^{-1})	0.014 ± 0.000	0.207 ± 0.000
pH	8.5	7.7
MO (%)	0.939 ± 1.07 Bajo	1.306 ± 0.085 Bajo
Densidad real (gmL^{-1})	2.502 ± 0.022	2.702 ± 0.000
Densidad aparente (gmL^{-1})	1.717 ± 0.102	1.809 ± 0.408
CC (%)	37.061 ± 0.106	36.704 ± 0.068
PMP (%)	22.539 ± 0.179	22.161 ± 0.032

	Arena	91 ±1.000	81 ±1.000
Partículas del suelo (%)	Arcilla	3.2 ±0.200	1 ±0.000
	Limo	5.8 ±1.200	18 ±1.000
	Textura	Arenosa	Franco Arenosa

Se muestran las medias ± D.E. (n=3).

7.2. Efecto de Cd en el desarrollo de *Phaseolus vulgaris*

7.2.1. Prueba de germinación

Los resultados de la prueba de germinación indicaron que *Phaseolus vulgaris* tiene un porcentaje de germinación en arena del 90 %, mientras que en papel este valor disminuye a un 80 % Cuadro 8.

Se pudo observar un comportamiento distinto de la semilla en ambos sustratos, pues la velocidad de germinación fue notablemente más rápida en la arena pues desde el segundo día se podía apreciar la radícula, mientras en el papel la radícula apreció hasta el cuarto día.

Moreno, (2017) germinó semillas de *P. vulgaris* obteniendo un porcentaje de germinación del 88.33 %. Esta diferencia de porcentaje entre lo obtenido en el estudio y lo reportado por Moreno se al medio utilizado para germinar pues se empleo algodón a diferencia del predesente experimento en el que se empleó arena y papel, también puede atribuirse a la diferencia de temperaturas mantenida durante la germinación pues es bien sabido que los tres factores que inciden en la germinación de las semillas son el sustrato, la temperatura y la iluminación (Herrera *et al.*, 2006).

Sin embargo el papel propicia la aparición de hongos que puede provocar pérdida de calidad en la semilla a causa de la ausencia de luz, al alto contenido de humedad

y la baja oxigenación que tiene en consecuencia (Ghangaokar y Kshirsagar, 2013), por lo que es más recomendable la germinación en arena.

Cuadro 8. Prueba de germinación de *P. vulgaris*.

Sustrato	4 día	5 día	6 día	Total de semillas germinadas	% de germinación
Arena	6	9	3	18	90
Papel	5	8	3	16	80

7.3. Cuantificación de Cd en arena y el suelo proveniente de Maconí, Cadereyta de Montes.

La cuantificación de Cd obtenida mediante espectroscopía de absorción atómica por la técnica de flama para la determinación de Cd en suelo de los muestreos se presentan en el Cuadro 9.

Los resultados de la cuantificación muestran que la concentración de Cd aumenta con relación al incremento de la dosis entre tratamientos y que conforme transcurre el tiempo del experimento la concentración disminuye, esto quiere decir que el Cd si esta siendo absorbido y traslocado hacía la planta. Se encontró presencia de Cd en las plantas testigo sin embargo estos se encuentran en niveles bajos.

En el muestreo 1, el tratamiento 1 arrojó una concentración de 77.882 mgkg^{-1} que disminuyó a 30.804 mgkg^{-1} en el muestreo 4, el tratamiento 2 fue de $110.374 \text{ mgkg}^{-1}$ a 50.326 mgkg^{-1} , mientras que el tratamiento 3 fue de 97.578 mgkg^{-1} a 60.060 mgkg^{-1} . En estos resultados puede interpretarse que las plantas crecidas en arena son más susceptibles a absorber mayores concentraciones de Cd, mientras que en el suelo de Maconí la absorción ocurre en menor medida. Esto puede deberse principalmente a las características físicoquímicas del sustrato.

Cuadro 9. Concentración de Cd en suelo durante los 4 muestreos realizados durante la experimentación.

Número de muestreo	Testigo (mgkg ⁻¹)	Tratamiento 1 (mgkg ⁻¹)	Tratamiento 2 (mgkg ⁻¹)	Tratamiento 3 (mgkg ⁻¹)
1	*0.518±0.002 ^d	77.822±1.281 ^c	110.374±1.107 ^a	97.578±0.968 ^b
2	*0.485±0.284 ^c	67.965±0.126 ^b	87.885±0.835 ^a	88.923±2.907 ^a
3	*0.428±0.371 ^b	59.776±1.280 ^a	76.579 ±1.280 ^a	71.218±16.206 ^a
4	*0.259±0.021 ^d	30.804±2.817 ^c	50.326±1.801 ^b	60.060±1.417 ^a

Se muestran las medias ± D.E. (n=3). Letras diferentes indican diferencia significativa (P= 0.05 usando prueba de comparación Tukey). *Valores >LQ: 0.576

Los resultados de la cuantificación de Cd en el tejido vegetal se muestran en el cuadro 10. Se observó un aumento en la concentración de Cd encontrada en hojas conforme transcurre el tiempo del bioensayo entre el muestreo 1 y el 3, durante el muestreo 4 la concentración vuelve a aumentar. En la hoja testigo la concentración de Cd inicia con 0.163 mgkg⁻¹ y concluye con 0.671 mgkg⁻¹. Este aumento puede ser debido a la presencia natural del Cd en la arena, a menores concentraciones el frijol bioacumula menos metal por lo que el resultado no se relaciona con los demás tratamientos.

Para el tratamiento 2 la concentración va de 0.465 mgkg⁻¹ a 5.446 mgkg⁻¹, mientras que para el tratamiento 3 es de 0.755 mgkg⁻¹ a 8.525 mgkg⁻¹. Estos últimos resultados coinciden con los estudios de Contreras y Zapata (2014) del efecto del Cu en frijol, encontraron que a mayor concentración del metal este se bioacumula más en otras partes de la planta, proponiendo como causa la bioquímica de

asimilación que depende de la concentración del metal en el suelo. Esta puede ser una explicación del comportamiento entre el frijol y el Cd.

Estos valores son más altos que los encontrados por Machado (2016) quienes en alcachofa reportaron concentraciones de 0.11 mgkg⁻¹ en hojas de alcachofa. Lizarazo *et al.* (2020) evaluaron en Sibapé, Colombia la bioacumulación de Cd en hojas de alcachofa y encontraron que puede almacenar hasta 0.22 mgkg⁻¹. Utilizando estos datos como referencia el frijol tiene hasta 3 veces más capacidad acumulativa en hojas que la alcachofa.

Cuadro 10. Concentración de Cd en hoja durante los 4 muestreos realizados durante la experimentación.

Número de muestreo	Testigo (mgkg ⁻¹)	Tratamiento 1 (mgkg ⁻¹)	Tratamiento 2 (mgkg ⁻¹)	Tratamiento 3 (mgkg ⁻¹)
1	0.163±0.002 ^d	0.465±0.017 ^c	0.755±0.006 ^a	0.521±0.002 ^b
2	0.229±0.009 ^d	0.477±0.018 ^c	0.602±0.021 ^a	0.680±0.013 ^b
3	0.367±0.018 ^c	0.537±0.005 ^b	0.6092±0.005 ^a	0.325±0.005 ^d
4	0.671±0.140 ^b	5.446±0.370 ^{ab}	8.525±0.237 ^a	5.287±0.508 ^b

Se muestran las medias ± D.E. (n=3). Letras diferentes indican diferencia significativa (P= 0.05 usando prueba de comparación Tukey).

Algunas hojas empezaron a presentar anormalidad en su desarrollo debido a la elicitación (Figura 8a, 8b). Monteiro *et al.* (2009) reportó inhibición del crecimiento como consecuencia de toxicidad de Cd en plantas, aunque no es un indicador de alteraciones a nivel bioquímicos, sino de una etapa inicial de estrés.

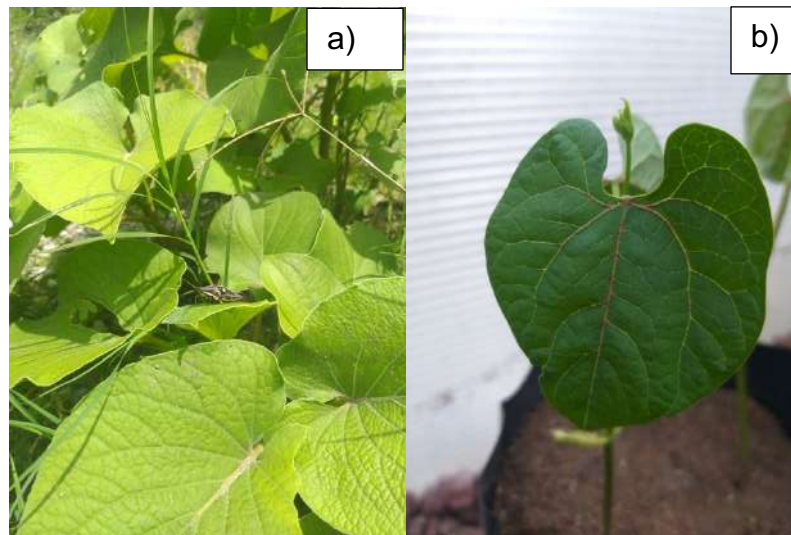


Figura 8. a) Hoja de *P. vulgaris* en condiciones normales, b) Hoja de *P. vulgaris* elicitada con Cd.

7.3.1. Determinación del factor de bioacumulación de Cd

Los datos de concentración de Cd en suelo y en tejido vegetal se utilizaron para calcular el índice de bioacumulación mostrado en el cuadro 11. Se puede observar que el índice incrementa al aumentar la concentración de Cd. Entre tratamientos no existe diferencia significativa de acuerdo con el análisis de varianza.

Karimi *et al.* (2019) reportaron en *Cynara scolymus L.* factores de bioacumulación de 0.52, 1.08 y 2.10 con dosis de 10, 50 y 500 μM de Cd, resultados muy por encima del los encontrados en frijol.

Los valores en los 3 tratamientos son <1 lo que indica que es un índice muy bajo de bioacumulación, los muestreos 3 y 4 de la planta testigo muestra valores > 10 lo que indica un bajo índice de bioacumulación.

Cerrón *et al.* (2018) observaron en maíz sometido a estrés por Cd valores < 1 , lo que califica al maíz como una planta exclusora o estabilizadora, con bajo índice de bioacumulación. Un estudio reportado por Falcón (2016) concluye que, si la

bioacumulación es < 1 la planta es acumuladora; pero si es > 10 la planta es hiperacumuladora.

Con base en este principio este trabajo prueba que en concentraciones elevadas *Phaseolus vulgaris* es una planta acumuladora de Cd, y en concentraciones naturales la planta puede absorber todo el Cd presente en el suelo.

Cuadro 11. Índice de bioacumulación de Cd en *Phaseolus vulgaris*

IBA %	Testigo	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3
Muestreo 1	0.314±0.005 ^a	0.004±0.000 ^b	0.005±0.000 ^b	0.005±0.000 ^b
Muestreo 2	0.572±0.255 ^a	0.005±0.000 ^b	0.007±0.000 ^b	0.008±0.000 ^b
Muestreo 3	5.252±8.023 ^a	0.007±0.001 ^a	0.006±0.001 ^a	0.005±0.001 ^a
Muestreo 4	2.588 ±0.503 ^a	0.178±0.023 ^b	0.170±0.011 ^b	0.088±0.010 ^b

Se muestran las medias ± D.E. (n=3). Letras diferentes indican diferencia significativa (P= 0.05 usando prueba de comparación Tukey).

7.4. Efecto en el crecimiento y desarrollo de la planta

7.4.1 Tallo y altura

Durante cada uno de los 4 muestreos realizados (Figura 9) se midió la altura de la planta (Cuadro 12) y el grosor del tallo. Las mayores alturas de plantas fueron las del tratamiento 3 (30 cm). Para los demás tratamientos se alcanzaron tallas de 27 cm y 18 cm (Tratamiento 2 y 3 respectivamente), mientras que las del grupo testigo se disminuyeron su talla de 26 cm a 22 cm. Además se puede observar que del muestreo 3 al muestreo 4 disminuye el la altura de las plantas en los 3 tratamientos y el testigo.

Chambi *et al.* (2012) al realizar estudios en cebada y papa encontraron que como consecuencia de la fitotoxicidad en los órganos de la planta se producen bajos rendimientos e inhibición de la formación de los granos y tubérculos, afectando en la capacidad productiva y en la calidad de los productos alimenticios.

También Edegbai y Bacit (2016) reportaron mortandad en *Phaseolus vulgaris* a los 28 días de haber sido sembrada al emplear concentraciones de Cd sobre 75 mg kg^{-1} . En el presente estudio hubo mortandad sin embargo la mayoría de los individuos lograron adaptarse y completar sus etapas fenológicas, esto puede deberse a las condiciones del bioensayo y a la variedad de frijol empleada (Figura 9).



Figura 9. *P. vulgaris* durante sus primeras etapas fenológicas.

De acuerdo con He *et al.*, 2008 el crecimiento retardado de la planta es debido a que el Cd puede sustituir el átomo de Mg y como consecuencia disminuye la actividad fotosintética. A lo anterior se le añade que la unión de iones metálicos a grupos sulfhidrilos de las proteínas se altera la estructura o el desplazamiento de un elemento esencial (Assche y Clijsters, 1990).

Cuadro 12. Alturas de *P. vulgaris* en los diferentes tratamientos

	Testigo (cm)	Tratamiento 1 (cm)	Tratamiento 2 (cm)	Tratamiento 3 (cm)
Muestreo 1	12.967±3.484 ^{ab}	16.431±4.305 ^{ab}	16.815±5.011 ^a	13.328±2.361 ^b
Muestreo 2	26.075±15.274 ^a	20.662±4.632 ^{ab}	21.269±6.541 ^{ab}	16.392±2.297 ^b
Muestreo 3	22.125±13.021 ^{ab}	27.300±11.804 ^{ab}	30.444±14.553 ^a	18.806±3.304 ^b
Muestreo 4	15.344±2.650 ^a	12.585±2.729 ^a	13.838±7.644 ^a	8.006±2.978 ^b

Se muestran las medias ± D.E. (n=3). Letras diferentes indican diferencia significativa (P= 0.05 usando prueba de comparación Tukey).

En el cuadro 13 se presentan los resultados obtenidos al medir el tallo durante los muestreos. Se puede observar que el tratamiento 3 fue el que presento mayor grosor de tallo con hasta 4 mm, seguida del tratamiento 2 con 3 mm, el tratamiento 1 con 2.8 mm y por último el testigo con 2.8 mm. Entre estos últimos datos no existe diferencia significativa de acuerdo al análisis estadístico.

Según Núñez *et al.* (2014) el tallo del frijol aumenta ante la presencia de algún estimulante externo. Maqueda (2015) estudio el efecto del Cd en el desarrollo del tallo de acelga y maíz ante la presencia de Cd, reportó que en concentraciones de

menores 1 mg el grosor del tallo disminuye, mientras que en concentraciones de 5 mg el grosor del tallo aumenta.

Cuadro 13. Tallo de *P. vulgaris* en los diferentes tratamientos

	Testigo (mm)	Tratamiento 1 (mm)	Tratamiento 2 (mm)	Tratamiento 3 (mm)
Muestreo 1	1.878±0.387 ^a	2.330±0.370 ^a	2.398±0.483 ^a	2.438±0.517 ^a
Muestreo 2	2.822±0.439 ^a	2.868±0.595 ^a	3.013±0.441 ^a	2.968±0.735 ^a
Muestreo 3	2.499±0.241 ^{ab}	2.338±0.524 ^{ab}	2.656±0.367 ^a	4.000±0.000 ^b
Muestreo 4	1.410±0.339 ^a	1.443±0.343 ^a	1.527±0.465 ^a	1.756±0.321 ^a

Se muestran las medias ± D.E. (n=3). Letras diferentes indican diferencia significativa (P= 0.05 usando prueba de comparación Tukey).

El cuadro 14 muestra la duración de las etapas fenológicas de *Phaseolus vulgaris* durante el bioensayo y lo compara con la ficha técnica proporcionada por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), (2009), el tiempo de germinación obtenido fue más bajo a comparación de lo que reporta el INIFAP, la aparición de hojas verdaderas se retrasó debido principalmente por la condiciones del experimento, el llenado de vainas se adelantó sin embargo la producción de las mismas se vió afectada por el metal ya que la planta no pudo producir suficientes.

Cuadro 14. Cuadro 14. Resultados de las etapas fenológicas del bioensayo.

	Obtenido en arena	INIFAP, 2009
% germinación	90	99
Germinación	6 d	7 d
Hojas verdaderas	6-13 d	7-11 d
Hojas trifoliadas	13-21 d	11-20 d
Floración	31-60 d	30-60 d
Llenado de vaina	62-90 d	76-87 d
Madurez fisiológica	110 d	87-110 d

7.5. Enzimáticos

7.5.1. Resultados de actividad PAL

Los resultados obtenidos (Cuadro 15) muestran que el tratamiento con mayor concentración de Cd (Tratamiento 2, 100 mg Cd kg⁻¹ suelo) es el que presenta mayor actividad enzimática. Específicamente durante el tercer muestreo. En general, se registro un aumento de la actividad enzimática en los tres primeros muestreos. Para frijol sembrado en el tratamiento 1 aumentó en un 127 %, para el tratamiento 2 en un 78%, mientras que el testigo solo fue del 81% y en el tratamiento 3 un 66 %. Estos resultados muestran que a concentraciones por debajo de 100 mg de Cd por kg de suelo la actividad enzimática de PAL aumenta.

Por otro lado, la disminución de la actividad de todos los tratamientos durante el muestreo 4 puede atribuirse al deterioro de la respuesta del sistema antioxidante por la etapa fenológica en la que se realizó el muestreo y que la planta alcanzó su máxima capacidad de respuesta ante el estrés por Cd (Sandalió, 2001; Schützendübel, 2001).

Zhang *et al.* (2005) reportaron que en hojas de *Allium Sativum* L. a concentraciones de 1 mM la actividad PAL aumenta, mientras que a concentraciones de 10 mM disminuye.

González-Mendoza *et al.* (2018) estudiaron la relación entre la actividad de la enzima PAL y compuestos fenólicos y flavonoides en *P. glandulosa* expuesta Cd y encontraron que en hoja la actividad PAL aumenta hasta un 284 % con concentraciones de 183 mg de Cd, valor superior al mayor obtenido en el tratamiento 2 con 81%. Además la respuesta del sistema antioxidante disminuye en altas concentraciones, de tal manera que la planta pierde la capacidad de sintetizar nuevos compuestos fenólicos y flavonoides y por lo tanto la actividad de PAL se va descativando. Por otra parte se han reportado resultados similares en *Euglena gracilis* a la exposición de concentraciones elevadas de Cd (Cervantes *et al.* 2016).

Es por lo anterior que como perspectiva puede plantearse realizar estudios de compuestos fenólicos y flavonoides a la par que se estudia la actividad de PAL, pues el aumento de la actividad PAL pudo ocurrir a través de la vía fenilpropaniodeto sugiere que la síntesis de metabolitos secundarios se realizó a través de la vía fenilpro pues al estar íntimamente relacionadas pueden volverse indicadores de síntomas tempranos de elicitación.

Cuadro 15. Actividad PAL.

Número de muestreo	Testigo (Ug ⁻¹)	Tratamiento 1 (Ug ⁻¹)	Tratamiento 2 (Ug ⁻¹)	Tratamiento 3 (Ug ⁻¹)
1	138.146±4.950 ^b	150.552±11.602 ^{ab}	207.106±10.459 ^a	204.116±5.959 ^{ab}
2	184.226±50.441 ^b	325.550±85.766 ^{ab}	354.001±2.154 ^a	290.662±55.065 ^{ab}
3	250.165±16.883 ^c	343.175±5.651 ^b	370.172±3.213 ^a	340.738±2.137 ^b
4	184.727±101.647 ^a	278.534±61.563 ^a	290.005±51.268 ^a	263.994±4.443 ^a

Se muestran las medias \pm D.E. (n=3). Letras diferentes indican diferencia significativa (P= 0.05 usando prueba de comparación Tukey).

7.5.2. Resultados de actividad SOD

Los resultados de la actividad SOD se muestran en el cuadro 16. Se observan altos valores durante los 2 primeros muestreos, en los muestreos 3 y 4 disminuye la actividad (Tratamiento 1, 2179.669 a 2.981), (Tratamiento 2, de 2294.707 a 3.268) y (Tratamiento 3, de 1995.740 a 4.113), esto puede deberse a una inhibición durante la fase de formación de vainas.

SOD al ser encargado de regular las cantidad de O_2^- y H_2O_2 evita que los radicales OH vayan hacia la membrana, proteínas y ADN, en el presente estudio al manifestarse disminución de la actividad en los dos últimos muestreos indica que la función de regulación de O_2^- se deteriora.

Smeets *et al.* (2005) reportaron en *P. vulgaris aureus* L y *P. vulgaris* L. disminución de la actividad SOD en hojas con concentraciones de 5 μ M de Cd. En plantas de frijol tratadas con Cd y Cu Younis *et al.* (2018) observaron un aumento progresivo de la actividad SOD a bajas concentraciones y disminución a elevadas cocentraciones.

Cai-Lin *et al.* (2013) estudiaron la actividad SOD en arroz encontrando cambios en la actividad de panículas y hojas. Wang *et al.* (2013) sometieron a 50 y 250 μ M de Cd a cuatro cultivares de arroz (S17, HA63, T3028, S825) reportando aumento en la actividad SOD en hojas y raíces.

Pérez *et al.* (2019) sometió plantas de arroz a 50, 100 y 300 $mgkg^{-1}$ de Ni y Pb, la actividad SOD disminuyó con respecto al control (0.08) reportando los valores menores con la tercera (0.06) y segunda dosis (0.05). Con Pb incrementó la actividad enzimática siendo similar la tercera dosis (0.03) al control (0.03).

La actividad SOD ha sido relacionada con la capacidad de bioacumulación y tolerancia en plantas de metales pesados, en guisante se ha comprobado que SOD

disminuye y mientras la planta cuenta con la capacidad de seguir bioacumulando más metal aumenta la actividad SOD (Sandalo *et al.*, 2001).

Con base a lo anterior después del muestreo 2 la actividad SOD pudo haber disminuido debido a que el frijo alcanzo su límite para bioacumular Cd y a su vez se inactiva SOD, o también puede ser debido a que la tolerancia del frijol depende del tiempo de exposición y que al alcanzar determinada etapa fenológica la inactivación de SOD se de naturalmente, sien embargo harían falta más estudios como los de espresión genética para determinar lo anterior, además de que servirías para saber exactamente en que isoforma se produce SOD en *P. vulgaris* Pinto Saltillo.

Cuadro 16. Actividad SOD.

Número de muestreo	Testigo (Ug ⁻¹)	Tratamiento 1 (Ug ⁻¹)	Tratamiento 2 (Ug ⁻¹)	Tratamiento 3 (Ug ⁻¹)
1	934.858±31.377 ^a	2629.126±1153.462 ^a	2746.308±1522.506 ^a	2456.360±292.056 ^a
2	11155.235±31.419 ^b	3015.741±703.887 ^a	3146.746±413.196 ^a	3274.087±16.322 ^a
3	1311.257±159.860 ^a	2179.669±1889.063 ^a	2294.707±93.774 ^a	1995.740±19.189 ^a
4	4.866±2.775 ^a	2.981±2.293 ^a	3.268±1.510 ^a	4.113±2.677 ^a

Se muestran las medias ± D.E. (n=3). Letras diferentes indican diferencia significativa (P= 0.05 usando prueba de comparación Tukey).

7.5.3. Resultados de actividad CAT

La actividad de CAT (Cuadro 17) aumento al elevar la concentración de Cd, en el testigo se produjo un nivel constante de actividad durante los 3 primeros muestreos, sin embargo durante el último muestreo la actividad se inhibió, esto puede ser debido a que exista menos H₂O₂ para descomponer y por tanto la actividad CAT este mas controlada.

Por otra parte, la respuesta del frijol con una baja actividad enzimática de CAT puede relacionarse con la respuesta positiva del mecanismo de protección ante las concentraciones de Cd durante los diferentes tratamientos. Con base en los valores mostrados en el cuadro 18 en el tratamiento 1 se observa menor actividad de CAT en contraste con el tratamiento 2 donde aumenta, por lo que se puede interpretar que la respuesta es mejor en dosis menores a 100 mg de Cd.

Mohamed *et al.* (2014) realizaron estudios del efecto de cobre en *Agave fourcroydes* donde reportaron que la actividad CAT se inhibía en concentraciones mayores a 25 mg de Cu y menores de 100 mg de Cu, lo que coincide con los resultados obtenidos.

Głowacka *et al.* (2019) emplearon 4 concentraciones de Cd en guisantes (50, 100 y 200 μ M) observaron disminución de actividad CAT en todos los análisis realizados., concluyendo que la célula no es capaz de eliminar el H₂O₂ acumulado en los tejidos.

Anteriormente se observó que la actividad SOD disminuye después del tercer muestreo, comportamiento también observado con CAT por lo que se puede deducir que SOD en *P. vulgaris* es capaz de controlar eficientemente las casacadas de ROS por que lo el trabajo de catalizador de CAT no es altamente demandado por la planta, así que lo produce en menores cantidades.

Las variaciones observadas en la actividad CAT no están relacionadas con la forma en la que se expresa la enzima, sin embargo si se relaciona con su estado de oxidación. Esto quiere decir que la estructura de la proteína se oxida mediante un mecanismo de inactivación en CAT por Cd.

Como perspectiva puede realizarse un estudio de expresión genética a fin de determinar que genes son los que participan en la síntesis de las subunidades CAT menos sensibles a la oxidación, y como consecuencia incrementa la actividad de CAT.

Cuadro 17. Actividad CAT durante los 4 muestreos realizados.

Número de muestreo	Testigo (Ug ⁻¹)	Tratamiento 1 (Ug ⁻¹)	Tratamiento 2 (Ug ⁻¹)	Tratamiento 3 (Ug ⁻¹)
1	2.597±0.185 ^a	2.352±0.290 ^a	2.703±0.613 ^a	2.026±0.165 ^a
2	2.365±0.019 ^a	2.534±1.182 ^a	2.912±0.697 ^a	2.194±0.158 ^a
3	2.301±0.689 ^a	2.138±0.249 ^a	2.763±0.337 ^a	2.077±0.802 ^a
4	0.282±0.099 ^a	0.734±0.873 ^a	0.898±0.193 ^a	0.506±0.443 ^a

Se muestran las medias ± D.E. (n=3). Letras diferentes indican diferencia significativa (P= 0.05 usando prueba de comparación Tukey).

7.5.2. Resultados de proteína

Los resultados de proteína se muestran en el cuadro 18. No se observaron diferencias significativas en la concentración de proteína entre el testigo y los tratamientos. El contenido de proteína aumento respecto al tiempo de muestreo esto puede estar relacionado con tolerancia al Cd pues la disminución de proteínas y la salida de solutos de las células indican senescencia (Beltrano *et al.*, 2006).

Huerta *et al.* (2015) detectaron disminución en proteínas solubles en 3 variedades de frijol (Flor de mayo, flor de junio y negro zacatecas) por exposición de 0.01, 0.1 y 10 gL⁻¹ Hg, siendo la más resistente negro zacatecas. Comparando con los resultados obtenidos, en Pinto Saltillo no hay disminución en la síntesis de proteínas.

Cuadro 18. Proteína.

Número de muestreo	Testigo	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3
1	26.833±0.544 ^a	28.957±0.090 ^a	26.957±0.322 ^a	27.683±2.508 ^a
2	28.331±1.766 ^a	29.874±0.102 ^a	27.8261±0.603 ^a	28.458±5.116 ^a
3	30.166±4.684 ^a	32.177±2.114 ^a	29.109±0.176 ^a	29.169±1.999 ^a
4	34.998±0.654 ^a	33.443±1.995 ^a	32.879±0.577 ^a	32.830±2.765 ^a

Se muestran las medias ± D.E. (n=3). Letras diferentes indican diferencia significativa (P= 0.05 usando prueba de comparación Tukey).

7.5.3. Resultados de semillas

Se realizaron estudios de bioacumulación de Cd, actividad de PAL SOD, CAT y proteínas, con el fin de identificar si el estrés por Cadmio es capaz de afectar su calidad. En el cuadro 19 se puede observar que no se detectó presencia de Cd en la semilla, pues la planta solo fue capaz de traslocarlo a su hoja.

Cuadro 19. Resultados de los análisis realizados en semilla de *P. vulgaris*.

Semilla	Testigo	Tratamiento 1	Tratamiento 2	Tratamiento 3
Concentración de Cd (mgkg ⁻¹)	ND	ND	ND	ND
PAL (Ug ⁻¹)	159.255±14.591 ^a	134.990±9.940 ^a	155.402±4.352 ^a	151.699±35.612 ^a
CAT (Ug ⁻¹)	10.193±2.553 ^a	16.699±3.069 ^{ab}	8.091±1.885 ^{ab}	13.781±2.948 ^b
SOD (Ug ⁻¹)	1.006±0.183 ^a	1.899±1.242 ^a	2.101±0.107 ^a	2.156±0.432 ^a
Proteína	83.496±3.262 ^a	81.706±4.828 ^a	79.138±5.723 ^a	88.849±4.205 ^a

Se muestran las medias \pm D.E. (n=3). Letras diferentes indican diferencia significativa (P= 0.05 usando prueba de comparación Tukey). ND= No detectable.

El número de vainas permite evaluar la cantidad de semillas obtenidas y a su vez indica el rendimiento de la cosecha. La mayoría de las vainas no fueron viables (no estaban llenas), otras si eran viables pero no lograron llenarse en su totalidad . Entre los tratamientos el mayor número de vainas se presentó en el 2 (9 vainas), seguido del 1 (8 vainas) y el que menor número de vainas tuvo fue el 3 (6 vainas).

La cantidad de semilla fue poca en términos de calidad y cantidad, el cuadro 20 muestra el número de semillas totales que se obtuvieron y su peso.

Cuadro 20. Número de semillas por tratamiento.

	Semillas Totales	Peso total (g)
Testigo	20	2.2407
Tratamiento 1	18	2.3934
Tratamiento 2	12	3.61
Tratamiento 3	4	0.3330

En el suelo de Maconí (Tratamiento 3, 102.1 mgkg⁻¹) fue donde se obtuvieron la menor cantidad cantidad de semillas y se esperar un mismo comportamiento en tratamiento 2 el cual tiene una concentración similar de Cd al tratamiento 3 (Tratamiento 2, 100 mgkg⁻¹), sin embargo se obtuvieron mayor cantidad de semillas. Ninguno de los tratamientos excedió los 2.4 g, no obstante el tratamiento 3 fue el que obtuvo la menor cantidad de semillas, lo que concuerda con su número de vainas. Si bien la producción se ve afectada, en la apariencia de las semillas no se ve un daño por estrés (Figura 10).

Las semillas del tratamiento 3 fueron la más afectadas por el metal pues su tamaño era mucho menor al igual que su peso. La semillas de mejor apariencia fueron las del testigo.



Figura 10. Semillas del bioensayo. a)Testigo, b)Tratamiento 1, c) Tratamiento 2, d)Tratamiento 3.

8. Conclusiones

Phaseolus vulgaris variedad Pinto Saltillo bioacumuló Cd en hojas reduciendo la concentración del metal en el suelo por lo que se acepta la hipótesis, pues metal es capaz de traslocarse hasta la hoja de la planta pero no alcanza a almacenarse en la semilla, por lo que las concentraciones menores a 100 mg de Cd por kg de suelo no representan un riesgo para la salud. Además la presencia de Cd afectó a *Phaseolus vulgaris* Pinto Saltillo principalmente en su desarrollo y crecimiento, sin embargo esto no fue impedimento para que lograra completar sus etapas fenológicas y llegar a la madurez.

La actividad enzimática aumentó en todas las enzimas analizadas por lo que se vuleve a aceptar la hipótesis ya que el Cd promueve el estrés oxidativo, esta actividad incrementa al aumentar la concentración del metal lo que no afecta el proceso de bioacumulación de la planta.

9. Referencias

- Ali H., Khan E., Sajad M. (2013). *Phytoremediation of heavy metals – Concepts and applications*. Chemosphere. 91 (2): 869-881.
- Al-Hossainy., Ahmed F., Adila E., Mohamed, Fatma S., Hassan M., Abd Allah. (2017). *Determination of cadmium and lead in perch fish samples by differential pulse anodic stripping voltammetry and furnace atomic absorption spectrometry*. Arabian Journal of Chemistry. 10: S347–S354.
- Allevato E., Stazi SR., Marabottini R., D’Annibale A. (2019). *Mechanisms of arsenic assimilation by plants and countermeasures to attenuate its accumulation in crops other than rice*. Ecotoxicol Environ Saf. 185:109701.
- Ammar, W.B., Nouairi, I., Zarrouk, M., Ghorbel, M.H., Jemal F. (2008). *Antioxidative response to cadmium in roots and leaves of tomato plants*. Biologia Plantarum. 54 (4): 727-731.
- Afiyanti, M., & Chen, H. J. (2014). *Catalase activity is modulated by calcium and calmodulin in detached mature leaves of sweet potato*. Journal of Plant Physiology. 171 (2): 35–47.
- Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades. (2016). Disponible en https://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts5.html (Revisión realizada en agosto 2020).
- Ahmad K., Wajid K., Khan ZI. (2019). *Evaluation of Potential Toxic Metals Accumulation in Wheat Irrigated with Wastewater*. Bull Environ Contam Toxicol. 102(6):822-828.
- Ashraf, U., Kanu, A.S., Mo, Z., Hussain, S., Anjum S.A., Khan, I., Abbas, R.N., Tang, X. (2015). *Lead toxicity in rice: effects, mechanisms, and mitigation strategies a mini review*. Environmental Science and Pollution Research. 22: 18318- 18332.

- Bahmani R., Bihamta M., Habibi D., Forozesh P. (2014). *Biochemical changes and growth responses induced by cadmium in bean seedlings (phaseolus vulgaris L.)*. J. Solid Waste Technol. Manag. 40: 126–135.
- Bahmani R., Kim D., Kim J., Hwang S. (2016). *The density and length of root hairs are enhanced in response to cadmium and arsenic by modulating gene expressions involved in fate determination and morphogenesis of root hairs in Arabidopsis*. Front. Plant.
- Bahmani R., Kim D., Na J., Hwang S. (2019a). *Expression of the tobacco non-symbiotic class 1 hemoglobin gene Hb1 reduces cadmium levels by modulating Cd transporter expression through decreasing nitric oxide and ROS level in Arabidopsis*. Front. Plant Sci.
- Bahmani R., Modareszadeh M., Kim D., Hwang S., (2019b). *Overexpression of tobacco UBQ2 increases Cd tolerance by decreasing Cd accumulation and oxidative stress in tobacco and Arabidopsis*. Environ. Exp. Bot. 166, 103805.
- Bahmani R., Modareszadeh M., reza Bihamta M. (2020). *Genotypic variation for cadmium tolerance in common bean (Phaseolus vulgaris L.)*. Ecotoxicology and Environmental Safety, Volúmen 190.
- Bahmani, R., Kim, D., Lee, B. (2017). *Over-expression of tobacco UBC₁ encoding a ubiquitin-conjugating enzyme increases cadmium tolerance by activating the 20S/26S proteasome and by decreasing Cd accumulation and oxidative stress in tobacco (Nicotiana tabacum)*. Plant Mol Biol. 94, 433–451.
- Bhargava A., Carmona F., Bhargava, M., Srivastava S. (2012). *Approaches for enhanced phytoextraction of heavy metals*. Journal of environmental management.105: 103-120.
- Biswas, S. K. (2016). *Does the interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox.? Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. p. 1-9.
- Bolaños M., Paz C. Cruz. (2016). *Mapa de erosión de los suelos de México y posibles implicaciones en el almacenamiento de carbono orgánico del suelo*. Terra Latinoamericana: 34,:271–288.

- Bradford, M. 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(1-2): 248–254.
- Cai-Lin G., Xiao-yong Y., Yang J. (2013). *Effect of heavy metal stress on different rice varieties of superoxide dismutase*. *Acta Agric. Nucleatae Sinica*. 17(4):286-291
- Chaney R. (2012). *Chapter two—food safety issues for mineral and organic fertilizers*. In: Donald L. Sparks (ed) *Adv Agron. Academic*. p. 51–116
- Chang Q., Diao Q., Wang L., Pan Z., Dang Guo W. (2018). *Effects of arbuscular mycorrhizal symbiosis on growth, nutrient and metal uptake by maize seedlings (Zea mays L.) grown in soils spiked with Lanthanum and Cadmium*. *Environ. Pollut.* 241: 607-615.
- Chen F., Li X., Zhu Q., Ma J., Hou H., Zhang S. (2019). *Bioremediation of petroleum contaminated soil enhanced by aged refuse*. *Chemosphere* 222: 98e105.
- Chmielowska J., Izbiańska K., Ekner A., Bayar M., Deckert J. (2018). *Cadmium Stress Leads to Rapid Increase in RNA Oxidative Modifications in Soybean Seedlings*. *Front. Plant Sci.* 8:2219.
- CONCON J.M. (2009). *Heavy metals in food*. In: *Food Toxicology, Part B: Contaminants and Additives*. New York, Dekker. 3 (4):1043-1045.
- Cortés E., Mugica V., González M., Carrillo R., Martínez M., Vaca M. (2013). *Natural revegetation of alkaline tailing heaps at Taxco, Guerrero, Mexico*. *Int. J. Phytoremediat.* 15: 127-141.
- Covarrubias S, Peña J. (2016). *Contaminación ambiental por metales pesados en México: problemática y estrategias de fitorremediación*. *Rev. Int. Contam. Ambie.* p. 7-21
- Cullen J., Maldonado T. (2013). *Cadmium: from toxicity to essentiality, metal ions in life sciences*. vol. 11. Springer Science and Business Media.
- Dary M., Chamber M., Palomares A., Pajuelo E. (2010). *In situ phytostabilisation of heavy metal polluted soils using Lupinus luteus*

inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. Journal of Hazardous Materials 177:323-330.

- Díaz JD, Arceo E. (2018). *Daño renal asociado a metales pesados: trabajo de revisión*. Rev. Colomb. Nefrol. V(1)
- Decker E. (1995). *The role of phenolics, conjugated linoleic acid, carnosine, and pyrroloquinoline quinone as nonessential dietary antioxidants*. Nutrition Reviews 53: 49-58.
- EPA. (2007). *Reporte de calidad del agua potable*. Edición de los Estándares de Agua Potable y Avisos de Salud. EPA 822-R-04-005.
- Falcón, E.J. (2017). *Fitoextracción de metales pesados en suelo contaminado con Zea mays L. en la Estación Experimental El Mantaro – Junín en el año 2016*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional del Centro del Perú – Huancayo - Perú.
- FAO. (2018). *Legumbres. Pequeñas semillas, grandes soluciones*. Ciudad de Panamá. 292 páginas. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
- FAO (2019). *El suelo en Organización de las naciones unidas para la alimentación*. [En línea] Disponible en: <http://www.fao.org/3/w1309s/w1309s04.htm> Revisión realizada en Julio 2020).
- Fernández, M. y Rodríguez, H. (2015). *El papel de la solubilización del fósforo en los fertilizantes microbianos*. ICIDCA: Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar 39(3): 27-34.
- Figlioli F., Sorrentino M., Memoli V., Arena C., Maisto G., Giordano S., Capozzi F., Spagnuolo V. (2019). *Overall plant responses to Cd and Pb metal stress in maize: growth pattern, ultrastructure, and photosynthetic activity*. Environ. Sci. Pollut. Res. 26: 1781–1790.
- Fransisca Y., Small M., Morrison P., Spencer J., Ball S., Jones A. (2015). *Assessment of arsenic in Australian grown and imported rice varieties on sale in Australia and potential links with irrigation practises and soil geochemistry*. Chemosphere. 138:1008–1013

- Fuentes M., Astudillo L., Díaz A., Martínez G. (2010). *Distribución de metales pesados en los sedimentos superficiales del Saco del Golfo de Cariaco, Sucre, Venezuela*. Rev. Biol. Trop. 58: 129-140.
- Furcal P.; Torres J., (2020). *Determinación de concentraciones de cadmio en plantaciones de Theobroma cacao L. en Costa Rica*. Tecnología en Marcha. Vol. 33-1: 122-137.
- Galante P., Sánchez E., Valverde M., Castillo E. (2013). *Biomarkers of exposure for assessing environmental metal pollution: from molecules to ecosystems*. Rev. Int. Contam. Ambie. 29: 117-140.
- Gill, S.S., Khan, N.A., Tuteja, N. (2012). *Cadmium at high dose perturbs growth, photosynthesis and nitrogen metabolism while at low dose it up regulates sulfur assimilation and antioxidant machinery in garden cress (Lepidium sativum L.)*. Plant Science. 182:112-120.
- Gill, S.S. y Tuteja, N. (2010). *Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants*. Plant Physiology and Biochemistry. 48: 909-930.
- Głowacka K., Żróbek-Sokolnik A., Okorski A., Najdzion J. (2019). *The Effect of Cadmium on the Activity of Stress-Related Enzymes and the Ultrastructure of Pea Roots*. Plants (Basel, Switzerland). 8(10):413.
- Grune T, Shringarpure R, Sitte N, Davies K. (2001). *Age-Related changes in protein oxidation and proteolysis in mammalian cells*. Journal of Gerontology. 56A: B459-B467.
- Guajardo-Flores D., Serna-Saldivar S. O. and Gutiérrez-Urbe J. A. (2013). *Evaluation of the antioxidant and antiproliferative activities of extracted saponins and flavonols from germinated black beans (Phaseolus vulgaris L.)*. Food Chemistry. 141: 1497-1503.
- Halliwell, B., Whiteman, M. (2004). *Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?*. British J Pharmacol. 142: 231-255.

- Halliwell, B. (2006). *Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life*. Plant Physiology. 141: 312-322.
- Halliwell, B., Whiteman, M. (2004). *Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?*. British J Pharmacol. 142: 231-255.
- Hasan M.; Cheng Y.; Kanwar M.; Chu X.; Ahammed J.; Qi Z. (2017). *Responses of plant proteins to heavy metal stress—a review*. Frontiers in plant science. 8: 1492
- Hasanuzzaman, M., Hossain, M.A., Teixeira da Silva, J.A., Fujita, M. (2012). *Plant response and tolerance to abiotic oxidative stress: antioxidant defense is a key factor*. In: Venkateswarlu, B. et al. (eds) *Crop stress and its management: perspectives and strategies*. p. 261-315. Springer Science+Business Media B.V.
- Hayat, S., Ahmad, H., Ali, M., Ren, K. & Cheng, Z. (2018). *Aqueous garlic extract stimulates growth and antioxidant enzymes activity of tomato (Solanum lycopersicum)*. Scientia Horticulturae. 240:139–146.
- He J., Li H., Ma C., Zhang Y., Polle A., Rennenberg, H., Cheng, X.Q., Luo Z, (2015). *Overexpression of bacterial gamma-glutamylcysteine synthetase mediates changes in cadmium influx, allocation and detoxification in poplar*. New Phytol. 205: 240–254.
- He, J.Y., Ren, Y.F., Hu, C.Z., Yan, Y. P., Jiang, D.A. (2008). *Effect of Cd on growth, photosynthetic gas exchange, and chlorophyll fluorescence of wild and Cd- sensitive mutant rice*. Photosynthetica. 46: 466-470.
- Huertos E. y Baena a. (2008). *Contaminación de Suelos por Metales Pesados*. Mancla revista de la sociedad española de mineralogía. 10: 48- 60.
- Imlay, J.A. (2008). *Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide*. Annual Review of Biochemistry. 77: 755-776.
- Jasmine, J., Mukherji, S. (2019). *Impact of bioremediation strategies on slurry phase treatment of aged oily sludge from a refinery*. J. Environ. Manag. 246: 625e635.

- Jiménez, R. (2017). *Introducción a la contaminación de suelos*. Mundi-Prensa Libros. pp. 497.
- Karuppanapandian T., Moon J., Kim C., Manoharan K., Kim, W. (2011). *Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms*. Aust. J. Crop Sci. 5:709-725.
- Khan, M., Mobin M., Abbas Z, AlMutairi K., Siddiqui, Z. (2016). Role of nanomaterials in plants under challenging environments. *Plant Physiology and Biochemistry*.
- Kozakowska, M., Pietraszek-Gremplewicz, K., Jozkowicz, A., Dulak, J. (2015). *The role of oxidative stress in skeletal muscle injury and regeneration: focus on antioxidant enzymes*. J Muscle Res Cell Motil. 36: 377-393.
- Kuppusamy S., Thavamani P., Venkateswarlu K., Lee Y., Naidu R., Megharaj M. (2017). *Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils: Technological constraints, emerging trends and future directions*. Chemosphere, 168: 944-968.
- León G., Osorio M., Torrenegra M., Gil C. (2015). *Extracción, caracterización y actividad antioxidante del aceite esencial de pletranthus amboinicus L.* Revista cubana de Farmacia. 49(4): 708-718.
- Li F., Shi W., Jin Z, Wu H., Sheng GD. (2017). *Excessive uptake of heavy metals by greenhouse vegetables*. J Geochemical Explor. 173:76-84.
- Li R., Wu H., Ding J., Fu W., Gan L., Li Y. (2017). *Mercury pollution in vegetables, grains and soils from areas surrounding coal-fired power plants*. Sci Rep. 7:1-9.
- Li T., Tao Q., Shohag M.J., Yang X., Sparks D., Liang Y. (2015). *Root cell wall polysaccharides are involved in cadmium hyperaccumulation in Sedum alfredii*. Plant and Soil 389: 387–399.
- Li X., Zhou Q., Wei S., Ren W., Sun X. (2011). *Adsorption and desorption of carbendazim and cadmium in typical soils in northeastern China as affected by temperature*. Geoderma 160:347–354

- Lindström K., Minna M.J., Hintsala H., Kaksonen A. (2013). *Potential of Galega-Rhizobium galegae system for bioremediation of oilcontaminated soil*. Food Technology and Biotechnology 12: 11-16.
- Lizarazo M., Herrera C., Celis C., Pombo L., Teherán A., Piñeros L., Forero, S., Velandia J., Díaz, F., Andrade W., Rodríguez O. (2020). *Contaminación de cultivos básicos por metales pesados en Sibaté, Colombia*. Heliyon (6), E04212.
- Londoño Franco LF. (2016). *Los riesgos de los metales pesados en la salud humana y animal*. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustria. XIV(2): p. 145-153
- Marrero J., Díaz A., Coto O. (2010). *Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la Biorremediación*. Revista CENIC Ciencias Biológicas, 41 (1): 67-78.
- Martínez I., Clemente R., Bernal M.P. (2010). *Efficiency of a phytoimmobilization strategy for heavy metal contaminated soils using white lupin*. Journal of Geochemical Exploration. 123: 95-100.
- Martorell J. (2010). *Biodisponibilidad de metales pesados en dos ecosistemas acuáticos de la costa Suratlántica andaluza afectados por Contaminación difusa*. Tesis Doctoral Universidad de Cádiz.
- McGrath S., Zhao F., Lombi E., (2001). *Plant and rhizosphere process involved in phytoremediation of metal-contaminated soils*. Plant Soil, 232:207-214.
- Minaya J. (2014). *Importancia de los minerales en la tecnología e industria y su impacto ambiental*.
- Mireles F., Dávila J., Pinedo J, Reyes E., Speakman R.J., Glascock M. (2012). *Assessing urban soil pollution in the cities of Zacatecas and Guadalupe, Mexico by instrumental neutron activation analysis*. Microchem. J. 103: 158-164.

- Mittal, M., Siddiqui, m. R., Tran, K., Reddy, S., Malik, A. B. (2014). *Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury*. Antioxidants & Redox Signaling. 20(7), 1126-1167.
- Moreno M., Cervantes V., Gallegos J., González R, Estrella I., García T., Herrera E., Díaz J., Rocha N. (2014). *Phenolic composition changes of processed common beans: their antioxidant and anti-inflammatory effects in intestinal cancer cells*. Food Research International 76: 79-85
- Muradoglu F., Gundogdu M., Ercisli S., Encu T., Balta F., Jaafar H., Zia-Ul-Haq M. (2015). *Cadmium toxicity affects chlorophyll a and b content, antioxidant enzyme activities and mineral nutrient accumulation in strawberry*. Biol. Res. p. 48.
- Navarro J., Aguilar I., López J. (2007). *Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas*. Ecosistemas. 16: 10-25.
- Navarro G., Navarro S. (2014). *Fertilizantes química y acción* .Ediciones Paraninfo, S.A., pp 195-196.
- Nenadis N., Wang L., Tsimidou M., Zhang H. (2004). *Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS (*+) assay*. J Agric Food Chem.
- Noguez A., López A., Carrillo R., González M. (2017). *Uso de leguminosas (fabaceae) en fitorremediación use of legumes (fabaceae) for phytoremediation*. Agroproductividad. 10(4):57-62.
- Oomah B. D., Corbé A., Balasubramanian P. (2010). *Antioxidant Anti-inflammatory Activities of Bean (Phaseolus vulgaris L.) Hulls*. Journal of agricultural and Food Chemistry 58: 8225-8230.
- Padmavathiamma P., Li L. (2007). *Phytoremediation Technology: Hyperaccumulation Metals in Plants*. Water, Air, & Soil Pollution, 184:105-126.

- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., Periyasamy, L. (2015). *Free radicals: properties, sources, targets, and their implications in various diseases*. Ind J Clin Biochem. 30(1): 11-26.
- Paz Ferreiro J., Lu H., Fu S., Méndez A., Gascó G. (2014). *Use of phytoremediation and biochar to remediate heavy metal polluted soils: a review*. Solid Earth, 5:65-75.
- Park S. (2016). *The association of asthma, total IgE, and blood lead and cadmium levels*. The Journal of Allergy y Clinical Immunology. p. 1701-1703.36.
- Pérez F., Flores R., Ochoa A., Orta S., Hernández B., Carizalez L., Pérez I. (2015). *Concentrations of persistent organic pollutants (POPs) and heavy metals in soil from San Luis Potosí, México*. Environ. Monit. Asses. 187, 4119.
- Pérez M., Rodríguez M., Molina A., Pedranzani H., Zirulnik F., Sandalio I., Romero M. (2014). *Estrés oxidativo del cadmio en Glycine max(L.)*. Plant Cell Environ, 37: 1672-1687.
- Pérez S., Cabezas D., Nayar B, Magallanes M.A., Sida J.P, Sánchez E., Ardisana E. (2019). *Respuesta inducida a enzimas antioxidativas en arroz bajo estrés por plomo y níquel*. Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas 10 (1):51-62.
- Per T., Khan S., Asgher M., Bano B., Khan N. (2016). *Photosynthetic and growth responses of two mustard cultivars differing in phytoalexin activity under cadmium stress*. Photosynthetica 54, 491–501.
- Petillo M., Puppo L., Hayashi R., Morales P. (2012). *Metodología para determinar los parámetros hídricos de un suelo a campo*. Disponible en <http://www.fagro.edu.uy/~hidrologia/riego/Metodologia%20para%20determinar%20los%20parametros%20hidricos%20de%20%20un%20suelo%20a%20campo.pdf> (Revisión realizada en septiembre 2020).
- Pirzadah T.; Malik B.; Tahir I.; Kumar M.; Varma A.; Rehman R.(2015). *Phytoremediation: an eco-friendly green technology for pollution prevention, control and remediation*. Soil Rem Plants Prospects Chall, 5: 107-126.

- Portuondo, L. (2011). *Efectos de los ácidos húmicos sobre el estrés por metales pesados en plantas de frijol (Phaseolus vulgaris L.)*. Universidad Agraria de La Habana (UNAH), MSc. Thesis, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.
- Ramírez R., Giraldo D., Barrera D. (2018). *Fitoextracción de cadmio con hierba mora (Solanum nigrum L.) en suelos cultivados con cacao (Theobroma cacao L.)*. Acta Agronómica, 67(3): 420-424.
- Reyes M., Peña D., Vargas L., González., Alarcón. (2010). *Metales pesados: importancia y análisis*. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Durango, Instituto Politécnico Nacional 15: 10-17.
- Reyes Y, Vergara I, Torres O, Díaz M, González E. (2016). Contaminación por metales pesados: implicaciones en salud, y seguridad alimentaria. Revista Ingeniería, Investigación y Desarrollo. XVI(2).
- Rizwan M., Ali S., Abbas T., Zia-ur-Rehman M., Hannan F., Keller C., Al-Wabel M., Ok Y., (2016). *Cadmium minimization in wheat: a critical review*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 130: 43–53.
- Romero, M.C., Terron M., Ros G. (2000). *The content and nutritional significance of minerals on fish flesh in the presence and absence of bone*. Food Chemistry 71: 503-509
- Romero-Puertas, M.C., Terrón-Camero, L.C., Peláez-Vico, M.A., Olmedilla, A., Sandalio, L.M. (2019). *Reactive oxygen and nitrogen species as key indicators of plant responses to Cd stress*. Environmental Experimental Botany. 161: 107-199.
- Sánchez V. (2001). INIFAP. *Fundación Produce Coahuila A.C. Pinto Saltillo nueva variedad de frijol para el Sureste del Estado de Coahuila*. Tríptico de información. Desplegable Técnica No. 8.
- Sandalio LM., Dalurzo HC., Gómez M., Romero-Puertas MC., del Río LA. (2001) *Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants*. J Exp Bot. 52(364):2115-26.

- Sankoumba Fadiga, M., ThÈ Thu, C., Pérez, Y., & González, G. (2014). Efecto de diferentes concentraciones de cobre en el medio de cultivo sobre plantas *in vitro* de *Agave fourcroydes* L. *Biotecnología Vegetal*, 14(2).
- Schützendübel A., Schwanz P., Teichmann T., Gross K., Langenfeld-Heyser R., Godbold Douglas., Polle A. (2001). *Cadmium-Induced Changes in Antioxidative Systems, Hydrogen Peroxide Content, and Differentiation in Scots Pine Roots*. *Plant physiology*. (127) 887-98. pp.127.3.887.
- Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural. (2019). *La importancia del frijol en México*. Disponible en <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/la-importancia-del-frijol-en-mexico?idiom=es> (Revisión realizada en septiembre 2020).
- SEMARNAT (2007). Norma Oficial Mexicana. NOM- 147-SEMARNAT/SSA1-2004. Que establece los criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio. Secretaría de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. Diario Oficial de la Federación.
- SEMARNAT. (2015). *Tipos de degradación"* en *Atlas digital geográfico*. [En línea] disponible en <http://ideinfoteca.semarnat.gob.mx/esdig/atlascontenido.html> (Revisión realizada en Julio 2020).
- SEMARNAT. (2018). *México posee 87 % de la diversidad de los suelos que existen en la Tierra*. [En línea] disponible en <https://www.gob.mx/semarnat/articulos/mexico-posee-87-de-la-diversidad-de-suelos-que-existen-en-la-tierra?idiom=es> (Revisión realizada en Julio 2020)
- SIAP-SAGARPA. (2019). *Expectativas de producción agropecuaria y pesquera*.
- Smeets, E. (2005). Does ICT contribute to powerful learning environments in primary education. *Computers and Education*, 44, 343-355.

- Tangvarasittichai, S. (2015). *Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus*. World J Diabetes. 6(3): 456- 480.
- Toscano, S., Ferrante, A., Leonardi, C. & Romano, D. (2018). PAL activities in asparagus spears during storage after ammonium sulfate treatments. *Postharvest Biology and Technology*, 140: 34–41.
- U.S. EPA. (2007). Method 3051A (SW-846): *Microwave Assisted Acid Digestion of Sediments, Sludges, and Oils. Revision 1*. Washington, DC
- Vamerli T., Bandiera M., Mosca G. (2010). *Field crops for phytoremediation of metal-contaminated land*. A review. *Environmental Chemistry Letters*, 8(1):1–17.
- Van Assche F., Clijsters H. (1990). *Effects of metals on enzyme activity in plants*. *Plant Cell Env.* 13: 195-206.
- Wang, X.; Zhong-Wei, Zh.; Shi-Hua, T.; Wen-Qiang, F.; Xu, F.; Zhu, F.; Da-Wei, Zh.; Jun-Bo, D.; Yuan, Sh. and Hong-Hui, L. 2013. Comparative study of four rice cultivars with different levels of cadmium tolerance. *Biologia*. 68(1):74-81.
- Yang B., Gao Y., Zhang C., Zheng X., Li B. (2019). *Mercury accumulation and transformation of main leaf vegetable crops in Cambosol and Ferrosol soil in China*. *Environ Sci Pollut Res*.
- Younis ME., Tourky S.M.N., Elsharkawy S.E.A. (2018). *Symptomatic parameters of oxidative stress and antioxidant defense system in Phaseolus vulgaris L. in response to copper or cadmium stress*. *South African Journal of Botany*. 117: (207-214).
- Zhang C., Appel E., Qiao Q. (2012). *Heavy metal pollution in farmland irrigated with river water near a steel plant-magnetic and geochemical signature*. *Geophys. J. Int* 192: 963-974
- Zhishen J., Mengchengt T., Jianming W. (1999). *The determination of flavonoids contents in mulberry and their scavenging effects in superoxide radicals*. *Food Chemistry* 64: 555-559.