

LA RESPUESTA DE HABA (*Vicia faba*, L.) CULTIVADA EN UN SUELO CONTAMINADO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE CADMIO

Elizabeth GARCÍA GALLEGOS^{1*}, Edelmira GARCÍA NIETO¹, Luis Felipe JUÁREZ SANTILLÁN²,
Libertad JUÁREZ SANTACRUZ¹, José Mariano Rigoberto MONTIEL GONZÁLEZ¹ y
Madaí Angélica GÓMEZ CAMARILLO³

¹ Centro de Investigación en Genética y Ambiente. Universidad Autónoma de Tlaxcala. Calle del bosque s/n, Col. Tlaxcala Centro, Tlaxcala, Tlax. CP. 90000

² Facultad de Química. Universidad Autónoma de Yucatán. Calle 41 No. 421 x 26 y 28. CP. 97150. Mérida, Yucatán, México

³ Centro de Investigación en Reproducción Animal. Universidad Autónoma de Tlaxcala. Calle del bosque s/n, Col. Tlaxcala Centro, Tlaxcala, Tlax. CP. 90000

*Autor responsable; gallegoseg@hotmail.com

(Recibido agosto 2011, aceptado febrero 2012)

Palabras clave: cadmio, clorofila, nodulación

RESUMEN

Después de 120 días de cultivo en condiciones de invernadero, se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de cadmio sobre algunas variables agronómicas y tres indicadores del crecimiento y desarrollo de la planta de haba (*Vicia faba*): pigmentos fotosintéticos, aspecto de los nódulos radicales e índice de nodulación; asimismo, se determinó la concentración del metal en suelo, raíz, tallo, hoja y vaina. En un diseño experimental de tipo unifactorial con cuatro repeticiones, la concentración de Cd con la que se comenzó fue la propia del suelo, 4.1 mg/kg, a la cual se le añadieron 20 y 40 mg/kg de Cd. Los resultados indican que las variables agronómicas evaluadas no presentaron diferencias estadísticamente significativas con el testigo ($p < 0.05$). La concentración de las clorofilas *a* y *b* fue significativamente mayor. Los nódulos se tornaron oscuros, efecto que se incrementó al aumentar la concentración de Cd. De igual modo, se observó una relación notable entre el índice de nodulación y la concentración de Cd ($p < 0.01$). Por otra parte, la raíz fue el órgano que absorbió más Cd, seguida de la hoja, el tallo y la vaina. Como planta completa, *V. faba* absorbió cantidades de Cd entre 8.6 y 65.2 mg/kg, concentraciones tóxicas para el ser humano. Lo anterior permite establecer criterios para evaluar el efecto del Cd en *V. faba*, ya que la capacidad de tolerar y absorber este metal es específica de cada especie vegetal. Así mismo, estas respuestas biológicas son excelentes indicadores de toxicidad en plantas expuestas a Cd y una herramienta para el monitoreo ambiental.

Key words: cadmium, chlorophyll, nodulation

ABSTRACT

After 120 days of growth under experimental greenhouse conditions, effect of soil cadmium concentration on some agronomic variables and three growth and development indicators –photosynthetic pigments, root nodule appearance, and nodulation index– of

the broad bean (*Vicia faba*) was evaluated; also, the Cd content in soil, root, stem, leaf, and pod were determined. A single-factor experimental design with four replications was used. The cadmium concentration this study started was of the soil, 4.1 mg/kg; then 20 and 40 mg/kg of Cd were added to the soil. The results indicate that agronomic variables showed no statistically significant differences with the controls ($p < 0.05$). Chlorophylls *a* and *b* were significantly higher. The color of the root nodules of the plant became dark and this effect intensified with increasing concentration of cadmium in soil; there was a significant relationship between the nodulation index and the cadmium concentration ($p < 0.01$). On the other hand, the root was the organ that absorbed more cadmium, followed by leaf, stem, and pod. As a whole plant, broad bean absorbed cadmium in the range of 8.6 to 65.2 mg/kg, concentrations toxic to humans. From the above, it is possible to set criteria for assessing the effect of Cd on broad bean because the ability to tolerate and absorb this metal is specific to each plant species. Lastly, these biological responses are excellent indicators of toxicity in plants exposed to cadmium and a tool for environmental monitoring.

INTRODUCCIÓN

El cadmio (Cd) es un metal pesado no esencial para las plantas y muy tóxico, cuya concentración en el suelo se incrementa progresivamente debido a actividades antrópicas, tales como la minería, fundición de metales, quema de combustibles fósiles, uso de fertilizantes fosfatados, fabricación de baterías, pigmentos y plásticos (Kabata-Pendias y Murkherjee 2007). Por lo general se encuentra en forma no bio-disponible, es poco soluble en agua y se encuentra unido a partículas del suelo, que por su capacidad de retención, acumula y concentra los metales. La acumulación ocurre en la parte biológicamente más activa del suelo, de modo que pueden ser fácilmente absorbido por las plantas. Las propiedades del suelo, principalmente las químicas, juegan un papel importante en la reducción o aumento de la toxicidad de los metales, la distribución de estos en los perfiles del suelo y su disponibilidad son reguladas por las características del metal y sus propiedades (Angelova *et al.* 2004, Chojnacka *et al.* 2005). La absorción de Cd por las plantas es un paso importante para la entrada de éste en la cadena alimentaria, su absorción y posterior bioacumulación dependen de las características del metal y de las propiedades fisicoquímicas de suelo (Prieto *et al.* 2009). Chan y Hale (2004) mencionan que el Cd se bioacumula en la raíz y sólo una pequeña proporción es traslocada a la parte aérea de la planta, concentrándose en orden decreciente en tallo, hoja, fruto y semilla. Al absorber las plantas este metal, la fitotoxicidad se expresa por la reducción de su crecimiento y elongación de las raíces, en parte debido a la interferencia de Cd con la nutrición mineral, debido a que dificulta la absorción y traslocación de elementos esenciales como Ca, Cu, Mn y Fe. La presencia de Cd

también provoca la disminución en la formación de nódulos en las leguminosas y en su actividad para fijar nitrógeno atmosférico (Manier *et al.* 2009). Por otra parte, entre los efectos fisiológicos se han observado (i) la perturbación en las funciones de los estomas en el intercambio de gases y pérdida de agua en forma de vapor, (ii) la reducción de los pigmentos fotosintéticos (clorofila *a*, *b* y carotenoides) y (iii) la interrupción de la integridad de las membranas celulares (Kurtyka *et al.* 2008). Pernía *et al.* (2008) indican que debido a la función vital que desempeñan las plantas en los ecosistemas, estos organismos han sido utilizados para la diagnosis o predicción de las consecuencias negativas de las actividades antrópicas, al facilitar el estudio y la evaluación de sus reacciones fisiológicas, bioquímicas, los mecanismos de adaptación y mortalidad y al entrar en contacto con las moléculas perniciosas resultantes de las actividades humanas. Este trabajo tiene el propósito de evaluar el impacto del Cd a diferentes concentraciones sobre los criterios de crecimiento y desarrollo de *Vicia faba*: pigmentos fotosintéticos y características de la nodulación y determinar la concentración de Cd en raíz, tallo, hoja y vaina en haba.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo de suelo y material vegetal

El estudio se realizó en invernadero con un suelo procedente del municipio de Ixtacuixtla de Mariano Matamoros, estado de Tlaxcala, México, localizado en las coordenadas 19°50' N y 98°21' O. Para el muestreo del suelo se empleó el método de zig-zag como lo establece la NOM-021-SEMARNAT-2000 (SEMARNAT 2002). Las semillas de haba provinie-

ron de suelos libres de agroquímicos, localizados en el municipio anteriormente mencionado, las cuales se lavaron con hipoclorito de sodio al 3 %, enseguida 3 enjuagues de agua destilada (Curto *et al.* 2005).

Diseño experimental

Se estableció un experimento unifactorial al azar. Se partió de la concentración inicial de Cd en el suelo de 4.1 mg/kg más la adición de 20 y 40 mg/kg. Se establecieron cuatro repeticiones por concentración de Cd para obtener un total de 12 unidades experimentales. El suelo se mezcló con la sal de cloruro de cadmio (CdCl_2) marca SIGMA, EUA. Se colocó en bolsas de polietileno de 4 kg. Se sembraron directamente dos semillas de haba en cada bolsa, al germinar sólo se dejó una planta por unidad experimental, el suelo se mantuvo a humedad constante hasta el momento de la cosecha.

Caracterización fisicoquímica del suelo y determinación de Cd

En el laboratorio el suelo se secó a temperatura ambiente y a la sombra, posteriormente se tamizó en malla de 2 mm de diámetro con el objeto de homogeneizar el tamaño de partícula para después determinar de acuerdo con la NOM-021-SEMARNAT-2000 (SEMARNAT 2002) el pH (relación 1:2 suelo:agua), la materia orgánica (MO) por el método de Walkley y Black, el nitrógeno total (Nt) por arrastre de vapor Kjeldahl, el fósforo (P) (Bray-1), el potasio (K) por fotometría de llama y la textura empleando el hidrómetro de Bouyoucos.

Las muestras de suelo fueron digeridas de acuerdo con el método EPA 3051 (EPA 1998). Las digestiones se aforaron a 50 mL con una solución de HNO_3 al 3 %. La determinación de Cd total en estos extractos fue hecha por espectroscopía de absorción atómica (Varian 880, Australia). La concentración de Cd se determinó antes y después de la adición de 20 y 40 mg/kg.

Variables agronómicas, contenido de clorofila y determinación de Cd

El experimento concluyó a los 120 días, se midió la altura de la planta (AP) y se cortó la parte aérea al ras del suelo, se extrajo la raíz, que se lavó con agua destilada para medir posteriormente su longitud (LR) y el volumen radical (VR) de acuerdo con el volumen de agua desplazado en una probeta de 1000 mL (Wu *et al.* 2005). Se cuantificó el número de vainas por planta (NV) y el número de nódulos (NN) de las raíces primarias y secundarias, de acuerdo con la pigmentación (nódulos marrón-rojizos y nódulos con necrosis). El índice de nodulación se calculó de acuerdo con el

número de nódulos totales por gramo de peso fresco total de la planta (Manier *et al.* 2009). La biomasa seca total (BST) se obtuvo al sumar el peso seco de raíz, tallo, hoja y vaina, que previamente se lavaron con agua destilada para eliminar partículas de polvo, se colocaron en bolsas de papel y se sometieron a 70 °C por 48 h en un horno de secado. Para obtener la biomasa seca del nódulo (BSN) se colocaron sobre papel kraft en recipientes de aluminio para secarlos a 70 °C por 24 h (Zhang *et al.* 2006).

De acuerdo con la técnica propuesta por Bruisma (1963), a los 90 y 120 días se seleccionaron hojas que no presentan daño aparente para determinar el contenido de clorofila *a* y *b*. La extracción de clorofila se realizó en frío y en oscuridad, moliendo 1 g del material vegetal fresco con 40 mL de acetona concentrada (J.T. Baker, EUA), el homogeneizado se filtró recibiéndolo en un matraz aforado de 100 mL. Posteriormente se lavó el resto del homogeneizado con dos porciones de 20 mL de acetona para finalmente aforar con agua destilada y obtener un extracto de pigmentos en acetona al 80 %. La cuantificación de los contenidos de clorofila *a* y *b* se realizó en un espectrofotómetro de UV a 663 y 645 nm. El contenido se expresó en mg de clorofila/gramo de material vegetal.

Las muestras de tejido vegetal de haba fueron digeridas de acuerdo con el método 3052 (EPA 1996). Las digestiones igual que en suelo se aforaron a 50 mL con una solución de HNO_3 al 3 % y la determinación de Cd en estos extractos se realizó por espectroscopía de absorción atómica (Varian 880, Australia).

Análisis estadístico

Se realizó el análisis descriptivo de cada variable, se compararon los tratamientos con un análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Tukey a un nivel de significancia de 0.05. A través del coeficiente de Pearson se evaluó el grado de asociación entre la concentración de Cd en el suelo a los 120 días y el índice de nodulación. Para determinar si existe diferencia significativa entre la concentración inicial y la final de Cd en el suelo, así como entre el contenido de clorofila a 90 y 120 días se realizó una prueba de T al 95 %, todo lo anterior utilizando el paquete estadístico Statgraphics versión 4.0.

RESULTADOS

Caracterización fisicoquímica del suelo y determinación de Cd

Al inicio del experimento el suelo presentó una textura franca en función del triángulo de texturas

(SSDS 1993) con 31.4 % de arena, 42.6 % de limo y 25.95 % de arcilla, pH alcalino de 7.2, baja cantidad de materia orgánica (0.54 %), bajo contenido de Nt (0.06 %), un valor medio de P (18.07 mg/kg) de acuerdo con la NOM-021-SEMARNAT-2000 (SEMARNAT 2002) y una concentración elevada de K (362 mg/kg) según la clasificación que establece Vázquez (1997) para suelos agrícolas.

La concentración inicial de Cd fue de 4.1 mg/kg clasificada como peligrosa para suelos agrícolas de acuerdo con la norma antes mencionada. Esta concentración inicial reportada en el suelo se puede asociar a la aplicación continua de fertilizantes fosfatados, los cuales aportan al suelo cantidades considerables de metales pesados como el Cd (Kabata-Pendias y Murkherjee 2007). A los 120 días se presentaron diferencias significativas por la prueba de T-pareada ($p \leq 0.05$) entre la concentración inicial y final de Cd con la adición de 20 y 40 mg/kg de Cd (**Cuadro I**), además de presentarse una reducción del 46.4 y 45.3 %, respectivamente. La concentración de Cd en el suelo al inicio y al final del experimento son valores considerados como peligrosos para el establecimiento de plantas en suelos de interés agrícola, de acuerdo con la normatividad mexicana.

CUADRO I. CONCENTRACIÓN DE Cd EN EL SUELO (mg/kg)

Inicial	Final	p*
4.1 ± 0.46	4.7 ± 0.3	0.1821
26.5 ± 1.71	12.3 ± 0.8	0.0007
42.8 ± 1.96	19.4 ± 5.1	0.0028

Media ± DE (n=4). *significancia de la prueba de T-pareada ($p \leq 0.05$).

Variables agronómicas, contenido de clorofila y determinación de Cd

Las variables agronómicas evaluadas en las plantas (**Cuadro II**) no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) al incrementarse la concentración de Cd en el suelo. Esto permitió

el crecimiento y el desarrollo del haba, aunque es importante señalar que al aumentar la concentración de Cd en el suelo tienden a disminuir los valores de estas variables.

Se determinó el contenido de clorofila *a* y *b* antes de la floración (90 días) y después de la floración (120 días) y no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de los pigmentos fotosintéticos ($p \leq 0.05$) por la prueba de medias de Tukey, por lo que se puede mencionar que las concentraciones de Cd permitieron que se llevara a cabo la actividad fotosintética del haba; sin embargo, la prueba T-pareada indica que existe una diferencia significativa entre 90 y 120 días por el contenido de clorofila *a* con la concentración inicial, no así al adicionar 20 y 40 mg/kg. En cambio, el contenido de la clorofila *b* fue estadísticamente diferente entre los periodos de tiempo (**Cuadro III**).

La exposición de la planta al suelo contaminado con Cd produjo daños tanto cualitativos como cuantitativos en la nodulación. La pigmentación de los nódulos se tornó a color negro conforme avanzó el tiempo de desarrollo de la planta y se incrementó el contenido de Cd en el suelo. Se observaron nódulos de color marrón-rojizo y con necrosis, el número de nódulos marrón-rojizo fue significativamente mayor en la concentración inicial de Cd en el suelo ($p \leq 0.05$) y el número de nódulos con necrosis fue significativamente superior a 80.29 % al incrementarse la concentración de Cd en el suelo (**Cuadro IV**). Finalmente, al cuantificar el peso seco de los nódulos, no existieron diferencias estadísticamente significativas con relación a las concentraciones de Cd, por lo que no es un indicativo de daño.

La variable del índice de nodulación –número de nódulos totales por gramo de peso fresco total de la planta– presentó una correlación negativa y significativa con la concentración de Cd en el suelo ($p < 0.01$) a los 120 días; se observa que a mayor contenido de Cd en el suelo existe una disminución del índice de nodulación de la planta (**Fig. 1**), el modelo explica el 53.5 % de la variabilidad de los datos.

CUADRO II. VARIABLES AGRONÓMICAS DE HABA

Concentración mg/kg	AP (cm)	NV	LR (cm)	VR (cm ³)	BST (g)
4.1 ± 0.46	81.7 ± 3.8 ^{a*}	5.5 ± 2.1 ^a	48.7 ± 1.4 ^a	77.5 ± 2.6 ^a	38.5 ± 2.9 ^a
26.5 ± 1.71	68.6 ± 3.7 ^a	7.5 ± 1.8 ^a	39.0 ± 2.7 ^a	70.0 ± 10.8 ^a	39.7 ± 3.8 ^a
42.8 ± 1.96	58.3 ± 8.6 ^a	11.2 ± 4.0 ^a	41.7 ± 5.4 ^a	67.5 ± 21.7 ^a	20.6 ± 7.1 ^a

*Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$). Media de Tukey ± DE (n=4). AP: altura de planta, NV: número de vainas, LR: longitud de raíz, VR: volumen radical, BST: biomasa seca total

CUADRO III. CONTENIDOS DE CLOROFILA *a* Y *b* ANTES DE LA FLORACIÓN (90 DÍAS) Y DESPUÉS DE LA FLORACIÓN (120 DÍAS) EN PLANTAS DE HABA

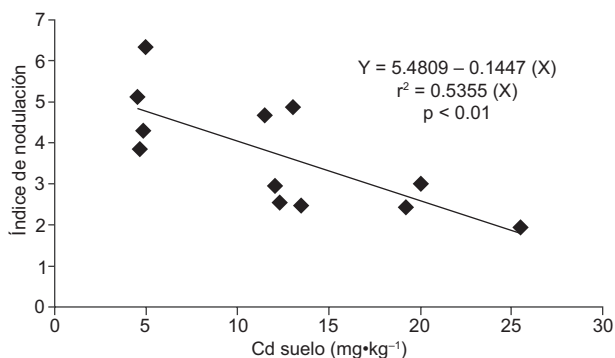
Concentración mg/kg	Clorofila <i>a</i> mg/kg tejido vegetal			Clorofila <i>b</i> mg/kg tejido vegetal		
	90 días	120 días	**p	90 días	120 días	**p
4.1 ± 0.46	142.3 ± 0.2 ^{a*}	179.7 ± 7.4 ^a	0.005	84.9 ± 0.8 ^a	172.3 ± 4.8 ^a	0.018
26.5 ± 1.71	122.6 ± 20.8 ^a	169.4 ± 12.4 ^a	0.185	77.4 ± 11.7 ^a	183.7 ± 7.3 ^a	0.010
42.8 ± 1.96	90.7 ± 11.9 ^a	142.5 ± 14.3 ^a	0.132	63.4 ± 9.6 ^a	173.6 ± 9.3 ^a	0.012

*Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$). Media de Tukey $\pm$ DE (n=4). **Significancia de la prueba de T-pareada entre 90 y 120 días por concentración

CUADRO IV. NÚMERO DE NÓDULOS DE COLOR MARRÓN-ROJIZO, NÓDULOS CON NECROSIS Y PESO SECO DE NÓDULOS EN LA RAÍZ DE HABA A LOS 120 DÍAS

Concentración mg Cd kg ⁻¹ suelo	Nódulos marrón-rojizo	Nódulos con necrosis	Peso seco total de nódulos (g)
4.1 ± 0.46	958.5 ± 203.4 ^{b*}	40 ± 26.3 ^a	0.767 ± 0.1 ^a
26.5 ± 1.71	384.5 ± 87.7 ^a	44.5 ± 145 ^a	0.862 ± 0.5 ^a
42.8 ± 1.96	238 ± 171.9 ^a	203 ± 33.3 ^b	0.582 ± 0.06 ^a

*Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)
Media de Tukey $\pm$ DE (n=4)

**Fig. 1.** Relación entre la concentración de Cd en el suelo a los 120 días y el número de nódulos totales en la raíz de haba

significativamente menores en la concentración inicial de Cd en el suelo (**Cuadro V**). En semilla no se reportan valores de Cd debido a que no se desarrolló en la vaina. La acumulación de Cd en la planta fue en el siguiente orden: raíz > hoja > tallo > vaina. Como planta completa se presentó un intervalo de 8.6 a 65.2 mg/kg de Cd por tejido vegetal. El rango de bioconcentración fue de 1.47 a 2.09, determinado por la relación entre el contenido de Cd total en la planta y la concentración de Cd en el suelo (Saraswat y Rai 2009). El resultado indica que la planta de haba se puede considerar como potencialmente acumuladora de Cd (**Cuadro V**).

La raíz de la planta fue el órgano que bioconcentró mayor cantidad de Cd de 3.8 a 37.1 mg/kg de tejido vegetal, además de observarse diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos. Las concentraciones de Cd en tallo, hoja y vaina fueron

DISCUSIÓN

El contaminar suelos a diferentes concentraciones de algún contaminante permite realizar estudios com-

CUADRO V. CONCENTRACIÓN DE Cd EN RAÍZ, TALLO, HOJA Y VAINA DE HABA A LOS 120 DÍAS

Concentración mg/kg	Raíz	Tallo	Hoja	Vaina	Total	IB
	mg/kg					
4.1 ± 0.46	3.8 ± 0.1 ^{a*}	1.5 ± 0.2 ^a	2.2 ± 0.6 ^a	1.1 ± 0.3 ^a	8.6	2.09
26.5 ± 1.71	22.2 ± 5.2 ^b	6.9 ± 2.4 ^b	7.4 ± 1.1 ^b	4.9 ± 3.3 ^{ab}	41.4	1.71
42.8 ± 1.96	37.1 ± 6.0 ^c	9.2 ± 1.2 ^b	9.8 ± 2.1 ^b	9.1 ± 5.0 ^b	65.2	1.47

*Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).
Media de Tukey $\pm$ DE (n=4). IB=Índice de bioconcentración

parativos; sin embargo, una desventaja es el hecho de introducir condiciones de alta movilidad del metal que no existen de manera natural en el suelo, ya que el equilibrio entre el suelo y el metal que se introdujo se alcanzaría en décadas, pero a pesar de la desventaja que esto representa es importante realizarlos debido a que se pueden determinar efectos de daño puntuales (Podlesáková *et al.* 2001). Lokeshwari y Chandrappa (2006) citan que la absorción de Cd por las plantas es regulada por el pH del suelo, tamaño de la partícula y capacidad de intercambio, así como por la exudación de la raíz y otros parámetros fisicoquímicos. El suelo utilizado para este estudio presentó un bajo contenido de materia orgánica y una baja proporción de arcilla, indicando pocos sitios de intercambio lo que permite una mayor disponibilidad del metal para absorberse (Kabata-Pendias y Mukherjee 2007).

Las concentraciones de Cd adicionadas al suelo no permitieron el desarrollo de semilla en la vaina del haba, se observó un ligero amarillamiento en sus hojas, la longitud de las raíces y la biomasa total de la planta tendieron a disminuir al incrementarse la concentración de Cd en el suelo. Al respecto, Dixit *et al.* (2001) reportaron que plantas de chícharo (*Pisum sativum* L. cv. Azad) expuestas a 4 y 40 μM de Cd por 7 días en condiciones hidropónicas, presentaron disminución en la acumulación de biomasa en raíces y en la parte aérea. Jalil *et al.* (1994) mencionaron que una aplicación de más de 0.1 μM de Cd en solución nutritiva, disminuye significativamente ($p \leq 0.05$) la biomasa de la parte aérea y la longitud total de la raíz de leguminosas. Kosobrukhov *et al.* (2004) encontraron que los efectos que provoca el Cd dependerán de la especie vegetal y especiación del metal. En haba (*Vicia faba* cv. Giza Blanka) no se encontró un efecto significativo en biomasa seca total y altura de planta por la presencia de Cd en el suelo (Kasim 2005). Kabata-Pendias y Pendias (2001) mencionan que leguminosas que crecen en suelos contaminados con Cd presentan generalmente en los bordes de sus hojas color café, clorosis, enrojecimiento en sus venas y peciolo, hojas curvadas y la raíz de color café. Las hojas de las plantas de haba en este trabajo mostraron un ligero amarillamiento que no afectó la actividad fotosintética, evaluada por el contenido de clorofila *a* y *b*; sin embargo, al incrementarse la concentración de Cd en el suelo se presentó una disminución en el contenido de los pigmentos fotosintéticos. La posible sustitución de los iones Mg que se encuentran en la parte central de la molécula de clorofila por metales (Hg, Cd, Cu, Ni, Zn ó Pb) que absorben las plantas que se desarrollan en suelos contaminados, podría explicar la disminución de la concentración de los

pigmentos fotosintéticos como la clorofila (He *et al.* 2008). Hocine *et al.* (2007) reportaron que en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) expuestas a concentraciones de 100, 140 y 180 mg de Cd (NO_3)₂ kg de suelo presentaron clorosis en las hojas, lo que ocasionó una disminución en el contenido de clorofila. Pernía *et al.* (2008) reportan que el Cd reduce el crecimiento, inhibe la apertura estomática, la síntesis de clorofila y la fotosíntesis, además ocasiona clorosis en las hojas, se disminuye la concentración de carotenoides y la tasa de transpiración, todo lo anterior depende de la especie vegetal. En este sentido, Kasim (2005) reporta que con 10^{-6} M de CdSO₄ en solución nutritiva el haba (*Vicia faba* cv. Giza Blanka) presentó una reducción significativa en la concentración de los pigmentos fotosintéticos (clorofila *a* y *b*). En cambio, en plantas de arroz se reporta que con 50 μM Cd el contenido de clorofila *a* fue de 2.11 y clorofila *b* de 0.682 g/kg, concentraciones menores a las que se reportaron en el testigo (He *et al.* 2008). La especie vegetal, inclusive la variedad muestran diferencias en cuanto al efecto que les causa la presencia de Cd.

Al incrementarse la concentración de metales pesados en el suelo se tiende a reducir la nodulación de las leguminosas (Manier *et al.* 2009). La formación de nódulos bajo condiciones de suelo favorables se inicia con la invasión a los pelos radicales por la bacteria *Rhizobium*, los pelos radicales sufren una deformación o enroscamiento bajo la influencia de algunos productos bacterianos, posteriormente se forma el nódulo y se desarrolla la actividad fijadora de nitrógeno atmosférico a través de los bacteroides de *Rhizobium* (Rivera *et al.* 2005). Los nódulos sanos en las leguminosas tienen un color marrón-rojizo debido a la presencia de iones de hierro y molibdeno en la leghemoglobina, molécula presente en gran abundancia en el tejido central de todos los nódulos fijadores de nitrógeno que se une reversiblemente al oxígeno (Baca *et al.* 2000). Chen *et al.* (2003) observaron en la raíz de soya (*Glycine max* (L). Merr.) nódulos alargados de color marrón-rojizo cuando crecieron en suelo no contaminado, pero desarrolla pequeños nódulos blancos en un suelo contaminado con Cd. Al evaluar la pigmentación de los nódulos y el índice de nodulación en haba por efecto de las concentraciones de Cd presentes en el suelo a los 120 días, la raíz presentó nódulos de color marrón-rojizo y nódulos necrosados. La pigmentación del nódulo va a depender del grado de desarrollo de la planta, los nódulos blancos indican poca eficiencia de los bacteroides de *Rhizobium* para fijar nitrógeno, los nódulos de color marrón-rojizo señalan una actividad eficiente de fijación y finalmente los nódulos que presentan necrosis indican ausencia total de los

iones hierro (Rivera *et al.* 2005). Manier *et al.* (2009) mencionan que la nodulación y específicamente el índice de nodulación (número de nódulos por gramo de biomasa fresca) es un bioindicador útil de la presencia de metales pesados en el suelo, sus resultados muestran una disminución en el índice de nodulación con 2.64 mg/kg de Cd al emplear *Trifolium repens* L. como planta indicadora, una $r^2=0.5699$ señala una asociación importante entre la concentración de Cd y el índice de nodulación, por lo que concluyen que es un bioindicador del incremento de las concentraciones de metales pesados en el suelo. En el presente trabajo, se obtuvo una $r^2=0.5355$ lo que indica que el 53.55 % de la nodulación es afectada por la presencia de Cd en el suelo. Andrad *et al.* (2004) reportaron que la formación de nódulos en plantas de *Vigna sinensis* (leguminosa) se afecta con 100 mg/kg de Cd en suelo, lo que impide la eficacia de los bacteroides de *Rhizobium* para fijar nitrógeno.

El Cd es un metal que se acumula principalmente en las raíces de las plantas y disminuye hacia la parte superior; por lo general el orden decreciente es el siguiente: raíz>tallos>hojas>frutos>semillas (Chan y Hale 2004). En este trabajo el orden difiere en hojas y tallo. La absorción de Cd por la raíz depende de su biodisponibilidad y concentración en el suelo, de la presencia de materia orgánica, el pH, el potencial redox, la temperatura, la concentración de otros elementos, la salinidad, la intensidad de la luz y el nivel de oxígeno (Pernía *et al.* 2008). Kabata-Pendias y Murkherjee (2007) y Kuffner *et al.* (2008) señalan que los exudados de las raíces de las plantas tienden a acidificar el medio, lo que trae como consecuencia la disminución del pH y un incremento en la biodisponibilidad de los metales por las plantas. En este trabajo, las plantas de haba absorbieron el Cd en un intervalo de 8.6 a 65.2 mg/kg de tejido vegetal. Al respecto, Kabata-Pendias y Pendias (2001) establecen que concentraciones de 5 a 30 mg/kg de Cd en tejido vegetal son consideradas fitotóxicas, por lo que con base en este intervalo las concentraciones encontradas en haba son tóxicas. Wang *et al.* (2002) reportaron que *Vicia villosa*, Roth. con 10 mg/kg de CdCl₂ en el sustrato de crecimiento que consistió de una mezcla de lodos residuales y suelo (1:3) absorbió una cantidad de 5 mg/kg de Cd. En un suelo contaminado con 1.6 mg/kg de Cd total se reportó en tallo de *Vicia faba* un contenido de 2.4 y en raíz 55.5 mg/kg de Cd, concentraciones tóxicas para el consumo humano (Zhang *et al.* 2006). Sin embargo, Prieto *et al.* (2007) reportan en raíz de habas cultivadas en suelos regados con aguas negras en Actopan, Hidalgo, concentraciones de Cd de 0.68 mg/kg y en frutos <0.0052 mg/kg.

CONCLUSIONES

La presencia de Cd impidió el desarrollo de la semilla en las vainas de las plantas de haba y provocó una disminución en el contenido de clorofila *a* y *b*. La nodulación en la raíz se redujo y el índice de nodulación del haba disminuyó al incrementarse la concentración de Cd en el suelo. La planta absorbió una mayor concentración del metal y principalmente la raíz. Estas respuestas biológicas son excelentes indicadores de toxicidad para plantas expuestas a Cd y una herramienta de gran utilidad para el monitoreo ambiental. El haba es una planta de consumo y su capacidad de absorber metales como el Cd y bioconcentrarlo en su tejido pudiera ser una etapa intermedia para la incorporación de este metal a la cadena alimentaria, aunque no se desarrolló semilla en vaina es posible que también lo bioconcentre, lo que representaría un riesgo al ser consumida.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo otorgado a través del proyecto P/PROME 103.5/11/1069 para la realización de este trabajo.

REFERENCIAS

- Angelova V., Ivanov K. y Ivanova R. (2004). Effect of chemical forms of lead, cadmium, and zinc in polluted soils on their uptake by tobacco. *J. Plant Nutrition* 27, 757-773.
- Andrad S., Abreu M. y Silveira A. (2004). Influence of lead additions on arbuscular mycorrhiza and *Rhizobium* symbioses under soybean plants. *Appl. Soil Ecol.* 26, 123-131.
- Baca B. E., Soto U. L. y Pardo R. M. A. P. (2000). Fijación biológica de nitrógeno. *Elementos: Ciencia y cultura*. 7, 43-49.
- Bruisma J. (1963). The quantitative analysis of chlorophyll *a* and *b* in plants extracts. *Protochem. and Photobiol.* 2, 241 – 249.
- Chan D. y Hale B. (2004). Differential accumulation of Cd in durum wheat cultivars: uptake and retranslocation as sources of variation. *J. Exp. Botany*. 55, 2571-2579.
- Chen Y.X., He Y. F., Yang Y., Yu Y. L., Zheng S. J., Tian G. M., Luo Y. M. y Wong M. H. (2003). Effect of cadmium on nodulation and N₂-fixation of soybean in contaminated soils. *Chemosphere* 50, 781-787.

- Chojnacka K., Chojnack H., Górecka A. y Górecki H. (2005). Bioavailability of heavy metals from polluted soils to plants. *Sci. Total Environ.* 337, 175-182.
- Curto L. L., Guzmán M. J. y Sánchez G. M. (2005). *Técnicas para el desarrollo en angiospermas*. 2a ed. Coordinación de servicios editoriales. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). 178 p.
- Dixit V., Vivek P. y Shyam T. (2001). Differential anti-oxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *J. Experiment. Bot.* 52, 1101-1109.
- EPA (1996). Method 3052 Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices. Environmental Protection Agency. 20 p. (en Internet página www.caslab.com/EPA-Methods/PDF/EPA-Method-3052.pdf).
- EPA (1998). Method 3051 Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils. Environmental Protection Agency. 24 p. (en Internet página www.caslab.com/EPA-Methods/PDF/EPA-Method-3051.pdf).
- He J. Y., Ren Y.F., Hu C. Z., Yan Y. P. y 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.
- Hocine B., Ghorab F. y Abdelbaki D. (2007). Cadmium as an environmental pollutant. Study of evolution of cadmium, its effects on beans (*Phaseolus vulgaris*) and its interaction with zinc. *Res. J. Applied Sci.* 2, 712-714.
- Jalil A., Selles F. y Clarke J. (1994). Growth and cadmium accumulation in two durum wheat cultivars. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 25, 2597-2611.
- Kabata P. A. y Pendias H. (2001). *Trace Elements in Soils and Plants*. 3a ed. CRC Press. 403 p.
- Kabata P. A. y Mukherjee A. B. (2007). *Trace elements from soil to human*. Springer, Berlin. 561 p.
- Kasim W. A. (2005). The correlation between physiological and structural alterations induced by copper and cadmium stress in broad beans (*Vicia faba* L.). *Egyptian J. Biol.* 7, 20-32.
- Kosobrukhov A., Knyazava I. y Mudrik V. (2004). Plantago major plants responses to increase content of lead in soil: growth and photosynthesis. *Plant Grow. Regul.* 42, 145-151.
- Kuffner M., Puschenreiter M., Wieshammer G., Gorfer M. y Sessitsch A. (2008). Rhizosphere bacteria affect growth and metal uptake of heavy metal accumulating willows. *Plant Soil.* 304, 35-44.
- Kurtyka R., Malkowski E., Kita R. y W. Karcz. (2008). Effect of calcium and cadmium on growth and accumulation of cadmium, calcium, potassium and sodium in maize seedlings. *Polish J. Environ. Studies* 17, 51-56.
- Lokeshwari H. y Chandrappa G. T. (2006). Impact of heavy metal contamination of Bellandur Lake on soil and cultivated vegetation. *Current Sci.* 91, 622-627.
- Manier N., Deram A., Broos K., Denayer F. O. y Haluwyn C. V. (2009). White clover nodulation index in heavy metal contaminated soils – a potential bioindicator. *J. Environ. Qual.* 38, 685-692.
- Pernía B., De Sousa A., Reyes R. y Castrillo M. (2008). Biomarcadores de contaminación por cadmio en las plantas. *Interciencia* 33, 112-119.
- Podlesáková E., Nemecek J. y Vácha R. (2001). Mobility and bioavailability of trace elements in soils. En: *Trace elements in soil. Bioavailability, flux and transfer* (I. K. Iskandar y M. B. Kirkham, Eds.). Lewis Publishers. Florida, EUA, pp. 21-41.
- Prieto G. F., Callejas H. J., Román G. A. D., Prieto M. J., Gordillo M. A. J. y Méndez M. M. A. (2007). Acumulación de arsénico en el cultivo de habas (*Vicia faba*). *Agronomía Costarricense* 31, 101-109.
- Prieto M. J., González R. C. A., Román G. A. D. y Prieto G. F. (2009). Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Trop. Subtrop. Agroecosys.* 10, 29-44.
- Rivera C.M.C., Trujillo N., Miranda M.A. y Maldonado E. (2005). Evaluación toxicológica de suelos contaminados con petróleos nuevo e intemperizado mediante ensayos con leguminosas. *Interciencia* 30, 326-331.
- Saraswat S. y Rai J. P. N. (2009). Phytoextraction potential of six plant species grown in multimetal contaminated soil. *Chem. Ecol.* 25, 1-11.
- SEMARNAT (2002). Norma Oficial Mexicana. NOM-021-SEMARNAT-2000. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreos y análisis. Diario Oficial de la Federación. 31 de diciembre 2002. 85 p.
- SSDS (1993). *Soil survey manual*. Handbook No. 18. Soil Survey Division Staff. United States Department of Agriculture (USDA). Washington D. C. 437 p.
- Vázquez A. A. (1997). *Guía para interpretar el análisis químico del agua y suelo*. 2a ed. Departamento de suelos. Universidad Autónoma Chapingo. 31 p.
- Wang Q. R., Liu X. M., Cui Y. S., Dong Y. T. y Christie P. (2002). Responses of legume and non-legume crop species to heavy metals in soils with multiple metal contamination. *J. Environ. Sci. Health A.* 37, 611 – 621.
- Wu C., Chen X. y Jianjun T. (2005). Lead accumulation in weed communities with various species. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 36, 1891-1902.
- Zhang X.H., Lin A. J., Chen B. D., Wang Y. S., Smith S. E. y Smith F. A. (2006). Effects of *Glomus mosseae* on the toxicity of heavy metals to *Vicia faba*. *J. Environ. Sci.* 18, 721-726.