

Efecto de metales pesados sobre la germinación de las semillas de Chumpipe (*Gonolobus niger*)

RESUMEN: En el presente trabajo se determinó el efecto toxicológico y la fitotolerancia de algunos metales pesados (MP) sobre la germinación de semillas de Chumpipe (*Gonolobus niger*), arbusto trepador de crecimiento silvestre del estado de Veracruz, México.

Los MP evaluados fueron cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), cromo ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), níquel (NiSO_4); zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) y mercurio (HgCl_2) a concentraciones crecientes. Se empleó la técnica de papel húmedo bajo un diseño de bloques y se incubaron bajo condiciones ambientales de iluminación y temperatura.

El cobre presentó toxicidad moderada. El cromo afectó el desarrollo de la raíz a partir de concentraciones superiores a 235 ppm. El níquel mostró un comportamiento dual, a bajas concentraciones favorece el desarrollo de las plántulas; a altas concentraciones presentó un efecto adverso. El zinc a concentraciones bajas no muestra toxicidad, sin embargo esta aumenta en función de la concentración. El mercurio mostró la mayor toxicidad, afectando severamente la germinación y el crecimiento de la plántula a partir de concentraciones superiores de 27 ppm. Se reporta una moderada tolerancia a cobre, zinc y mercurio.

PALABRAS CLAVE: Chumpipe, *Gonolobus niger*, metales pesados, fitotoxicidad.



Colaboración

Jesús Bello Palomino; Gabriel Grosskelwing Núñez; Rubén Enrique Cuevas Alarcon; Luis Mejía Macario; Arturo Cabrera Hernández, TecNM: Instituto Tecnológico Superior de Misantla

Fecha de recepción: 10 de septiembre de 2022

Fecha de aceptación: 07 de noviembre de 2022

ABSTRACT: In the present work, the toxicological effect and phytotolerance of some heavy metals (MP) on seeds of Chumpipe (*Gonolobus niger*), a wild-growing climbing shrub from the state of Veracruz, Mexico, was determined.

The MPs evaluated were copper ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), chromium ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), nickel (NiSO_4); zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) and mercury (HgCl_2) at increasing concentrations. The wet paper technique was used under a block design and they were incubated under environmental lighting and temperature conditions.

Copper presented moderate toxicity. Chromium affected root development from concentrations above 235 ppm. Nickel showed a dual behavior, at low concentrations it favors the development of seedlings; at high concentrations it presented an adverse effect. Zinc at low concentrations does not show toxicity, however it increases as a function of concentration. Mercury showed the highest toxicity, severely affecting germination and seedling growth from concentrations above 27 ppm. A moderate tolerance to copper, zinc and mercury is reported.

KEYWORDS: Chumpipe, *Gonolobus niger*, heavy metals, phytotoxicity.

INTRODUCCIÓN

El agua es un recurso natural esencial para la vida de los seres vivos, siendo indispensable en la naturaleza y en las actividades económicas, agrícolas, industriales y de salud humana, cuya demanda aumenta de manera acelerada mientras su disponibilidad es limitada [1]. El uso indiscriminado e irresponsable, así como el agotamiento de las reservas acuíferas asociados al cambio climático y la contaminación de las fuentes naturales ha comprometido severamente el acceso a este vital líquido. Esta situación se agrava en países en vías de desarrollo, donde la gestión, protección, monitoreo y legislación del agua es deficiente, ocasionando la degradación en la calidad y la contaminación de esta [2].

Diversos contaminantes de tipo biológico, orgánico e inorgánico asociados a lixiviados de vertederos o efluentes de aguas residuales industriales o

agrícolas, comprometen la calidad del agua. Los contaminantes inorgánicos incluyen pigmentos, álcalis, minerales, ácidos, cianuros, fluoruros y metales pesados liberados por residuos electrónicos, minería, industria metal-mecánica, agricultura, etc. [3]. El término "metales pesados" se aplica a un grupo de elementos químicos que presentan una densidad relativamente alta, tóxicos o venenosos incluso a baja concentración y con una alta solubilidad en agua. Se ha detectado al Cd, Cr, Cu, Ni, As, Pb y Zn como los MP más dañinos al medio ambiente, bioacumulándose en animales y plantas a través de la cadena alimenticia [4].

La toxicidad en las plantas varía en relación a la especie de planta, al tipo de MP, concentración, estado de oxidación y pH, los cuales pueden ser absorbidos por las plantas a través de sistemas convencionales de transportadores de metales [5]. Diversos estudios se han enfocado en estudiar la interacción de plantas de interés agrícola con los MP, sin embargo, un gran número de plantas silvestres endémicas no se ha determinado cual es el efecto de los MP en ellas.

El Chumpipe (*Gonolobus niger*) es un arbusto trepador de crecimiento silvestre que se distribuye desde el sur de México y Centroamérica hasta el norte de Sudamérica. De acuerdo a la región se le denomina Talayote o Cahuyote (Sur de México), Chuchamber (Guatemala y El Salvador), Cuayote o Gallinita (Costa Rica), Chinchayote (Nicaragua), etc. Su fruto es fusiforme, de color verde claro al madurar, con una longitud de entre 10-12 cm. Los frutos maduros contienen en su interior una gran cantidad de semillas con un característico mechón de pelos que les permiten dispersarse a través del viento [6].

En algunas regiones el fruto es comestible, una vez que se ha eliminado el látex. Dulces y conservas son elaborados con el fruto maduro. En diversos pueblos de la Cuenca de Papaloapan y del Coatzacoalcos se consume la raíz como agente espumante de una bebida tradicional denominada "Popo". La medicina tradicional le confiere propiedades para tratar una enfermedad de transmisión sexual [7].

En el presente proyecto evaluamos los efectos de algunos MP sobre las etapas más sensibles del desarrollo de una planta, la germinación de semillas y crecimiento de plántula de *G. niger*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los frutos de Chumpipe fueron recolectadas de plantas de aspecto saludable en la zona rural de la ciudad de Misantla. Se eligieron frutos maduros bajo el criterio del cambio de coloración de verde a amarillo claro en la corteza del fruto. Los frutos recolectados se transportaron inmediatamente al Laboratorio de Investigación Avanzada de Veracruz (LIAV), y se conservaron en bolsas de papel dentro de un recipiente de vidrio a

temperatura ambiente hasta la apertura natural del fruto, proceso que libera las semillas que se emplearon en este estudio.

Para evaluar el efecto de MP en la germinación se seleccionaron sales de cinco MP: cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), cromo ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), níquel (NiSO_4), zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) y mercurio (HgCl_2), evaluando cinco concentraciones crecientes para cada metal pesado. Como control negativo se empleó agua destilada en un diseño en bloques al azar.

Acondicionamiento de las semillas

Las semillas fueron sanitizadas con una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 10 minutos y se enjuagaron 3 veces con agua destilada. Lotes de semillas se sumergieron durante 24 hrs en cada una de las soluciones de MP, previo a colocarse en los contenedores de germinación. Este se consideró el punto inicial para el estudio de dicha variable.

Experimentos de germinación

Los experimentos fueron realizados en las instalaciones del Tecnológico de Misantla, Veracruz, México; bajo condiciones ambientales de iluminación y temperatura, durante los meses de octubre y noviembre del 2019. Se aplicó la técnica de papel húmedo donde a contenedores de plástico de 11 cm de diámetro se les colocó como soporte círculos de papel filtro, el cual fue humedecido con 15 ml de las distintas soluciones para cada tratamiento de MP aplicado [8]. 25 semillas se colocaron sobre el papel filtro de manera uniforme y distribuidas espacialmente de manera homogénea. El ensayo se realizó por triplicado y como control negativo se empleó agua purificada. El diseño de experimentos por bloques se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Protocolo de germinación de semillas de *G. niger* bajo estrés abiótico por metales pesados.

Metales	Control	Trat 1 (ppm)	Trat 2 (ppm)	Trat 3 (ppm)	Trat 4 (ppm)
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Agua destilada	269	318	367	416
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$		177	235	294	353
NiSO_4		155	464	774	1,083
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		280	841	1,402	1,963
HgCl_2		27	81	136	190

Se aplicó un régimen de riego ajustado para mantener el nivel de agua que se perdió por evaporación. Se registró diariamente el número de semillas germinadas de cada contenedor durante 7 días.

Biometría de las plántulas

Al día siete se efectuaron las mediciones de la longitud de tallo y longitud de la raíz de cada plántula crecida bajo los diferentes tratamientos. Además, empleando

una balanza analítica, se pesó la raíz y el tallo de cada plántula. Los datos obtenidos se registraron en un archivo digital a fin de realizar las pruebas estadísticas.

Análisis estadísticos

Para el análisis de datos se utilizó el programa de EXCEL® 2016. Los datos de los diferentes tratamientos se analizaron para evaluar la calidad de los mismos y verificar la presencia de datos atípicos. Se comprobó la normalidad de los datos aplicando la prueba de Shapiro-Wilks y la homocedasticidad con la prueba de Levene. Para encontrar diferencias significativas entre medias obtenidas entre del control y al menos una de las diferentes concentraciones aplicadas, se realizó un análisis estadístico tipo ANOVA ($p < 0.05$). Como prueba post-hoc se aplicó la prueba de Tukey para determinar significancia en las diferencias de medias, las cuales se señalan en la parte superior de cada barra. Letras iguales indican que no hubo diferencia significativa.

RESULTADOS

Resultados del efecto toxico de MP en la germinación de semillas de *G. niger*.

Los efectos de las concentraciones crecientes de cobre, cromo, níquel, zinc y mercurio sobre el porcentaje de germinación de *G. niger* se presenta en la Figura 1. Para el cobre, la germinación de semillas de *G. niger* presento un ligera disminución no significativa en el porcentaje de germinación a todas las concentraciones evaluadas, mostrando tolerancia a este metal para germinar hasta 416 ppm de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Comparativamente, estudios previos realizados en semillas de *Lens culinaris* mostraron que a 100 ppm se presenta una disminución del 50% en el porcentaje de germinación [9]. En otro estudio realizado en *Triticum aestivum*, se reporta que a concentraciones mayores a 100 ppm disminuye 60% la germinación, efecto relacionado a la actividad de la enzima peroxidasa [10]. En contraste, *G. niger* no mostró una disminución significativa a concentraciones de 460 ppm, lo cual demuestra que durante la germinación, presenta una alta resistencia a concentraciones de cobre.

En el caso del cromo, la germinación disminuye aproximadamente 30% con relación al control negativo, aunque no es significativa, lo cual sugiere baja tolerancia de la semilla de *G.niger* a germinar frente al estrés químico de cromo.

Estudios previos en *Vigna radiata* L., *Trigonella foenum-graceum* L., *Pennis etum glaucum* L., *Sorghum vulgare* L *Oryza sativa* L mostraron que estas especies presentan una disminución drástica del 50% y a partir de los 200 ppm se reduce al 50%, [11]. Semillas de trigo, cebada, centeno y avena son altamente susceptibles al cromo, y a concentraciones menores a 100 ppm, presentan disminuciones severas en la germinación [12], comportamientos similares al que presentó *G.niger*.

El efecto del níquel sobre la germinación de semillas de *G. niger* mostró una disminución no significativa a concentraciones de 155 y 464 ppm, sin embargo a la concentración de 774 ppm se mostró una severa reducción superior al 95% en el porcentaje de germinación y a concentraciones de 1083 ppm en adelante, la germinación es totalmente inhibida. Este comportamiento es similar a los reportados previamente para otras semillas; mientras a baja concentración no se afecta la germinación, al incrementar la concentración a 150 ppm de níquel, se observa una inhibición del 50% para semillas de trigo, cebada, avena, colza y zanahoria [12]; mientras que para diversas variedades de trigo, la germinación se inhibe entre un 20 y un 40%. a concentraciones de 75 ppm [13]. En general, todas estas semillas observan comportamientos similares al mostrado por *G. niger*.

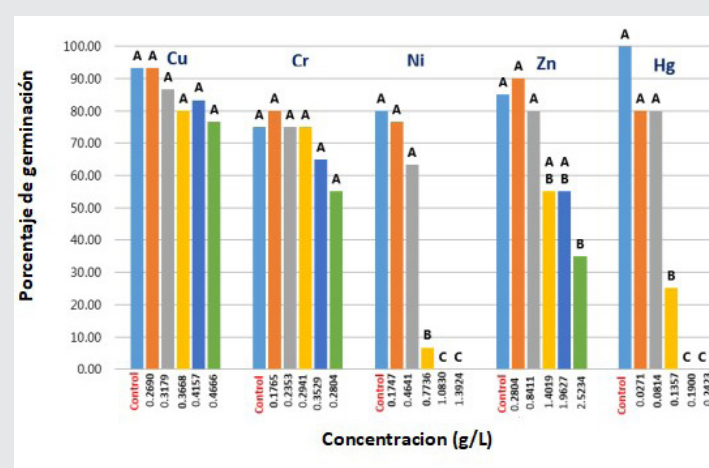


Figura 1. Efecto de metales pesados sobre el porcentaje de germinación de *G. niger*. Se presentan los valores promedio del porcentaje de germinación de tres replicas en presencia de concentraciones crecientes de los metales pesados evaluados. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 269, 318, 367, 416 y 465 ppm, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$; 177, 235, 294, 353 y 412 ppm, NiSO_4 ; 155, 464, 774, 1083 y 1392 ppm, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 280, 841, 1402, 1963 y 2523 ppm y HgCl_2 ; 27, 81, 136, 190 y 244. Las diferencias significativas se indican en la parte superior de cada barra, letras similares indican que no hubo diferencia significativa $p < 0.05$.

Para el zinc se observa que al aumentar la concentración disminuye el porcentaje de germinación; a concentraciones bajas de 280 y 841 ppm el efecto toxico no es significativo, a 1402 y 1963 ppm el efecto es significativo, y a 2523 ppm la germinación se reduce en un 75%. Estudios comparativos de diferentes especies incluyendo *Vigna unguiculata*, *Cassia angustifolia*, y *Glycine maxsimar* presentan comportamientos similares en la germinación, sin embargo *G.niger* presenta una mayor tolerancia a germinar en concentraciones mayores de este metal [14].

El mercurio es uno de los metales pesados con mayor capacidad de dañar la naturaleza. y cada vez hay más evidencias que demuestran que puede acumularse

fácilmente en las plantas acuáticas y superiores [15]. Por lo que se decidió incluir a este metal en el presente estudio.

A concentraciones de 27 y 81 ppm no se observó diferencia significativa, pero a 136 ppm la germinación disminuyó en un 70%, y a 190 y 244 ppm se inhibió completamente. Similar comportamiento ha sido reportado para otras semillas incluyendo *Vigna ambacensis* L, con tolerancia de hasta 27 ppm y nula germinación a 270 ppm [16]

Efecto de cobre sobre el peso y longitud de la raíz y tallo de *G. niger*.

A fin de determinar algún efecto fitotóxico subletal crónico o agudo significativo que interfiera en el desarrollo normal de la plántula, se realizaron análisis comparativos de los pesos de raíz y tallo (Figura 2) así como longitud de tallo y raíz (Figura 4) en ausencia y presencia de las concentraciones de MP propuestas. Cada barra representa el promedio de cada una de las variables de respuesta y las diferencias significativas se indican con letras mayúsculas en la parte superior de cada barra.

El cobre, un micronutriente esencial para el crecimiento de la planta, presentó un efecto de disminución significativa del peso del tallo en alrededor del 30% a todas las concentraciones evaluadas, mientras en raíz alcanzo un 50%, lo cual sugiere la pérdida de biomasa en la raíz como la actividad fisiológica más afectada por la presencia de cobre, aunque es independiente de la concentración evaluada. Para la longitud del tallo, se observa un comportamiento similar, con una disminución de la longitud de tallo en un 40% y la radícula en un 66% con respecto al control, pero entre tratamientos no existe diferencia significativa.

Nuestras observaciones son concordantes con el comportamiento de estas variables en estudios previos para plántulas de *Trigonella foenum-graceum* L., *Lens culinaris* y *Triticum aestivum* [9,10], los cuales han sido asociados a la formación de especies reactivas de oxígeno, alteraciones en la absorción de nutrientes esenciales, así como oxidación de lípidos de membrana [17], sin embargo *G.niger* tolera concentraciones relativamente más altas de cobre sin disminuir severamente la longitud y el peso de la raíz y tallo, lo cual sugiere la presencia de algún mecanismo de tolerancia, propiedad que sugiere un potencial uso en estudios de fitoremediación de suelos contaminados con cobre.

Efecto de cromo sobre el peso y longitud de la raíz y tallo de *G. niger*.

En el desarrollo del tallo bajo estrés abiótico por cromo, a la menor concentración de 177 ppm existe una disminución no significativa con respecto al con-

trol, pero a partir de la segunda concentración, esta disminución es significativa y se mantiene alrededor del 50% y es similar en el resto de los tratamientos, sin embargo para el peso de la raíz el efecto fue severo y provoco una reducción del 90% en todos los tratamientos. Los efectos fueron proporcionales para las variables de salida del peso y la longitud de la raíz y el tallo.

En diversos estudios se ha reportado que el cromo ejerce efectos severos del desarrollo radicular y en menor grado del tallo, efecto que ha sido asociado a estrés oxidativo y alteraciones en la absorción del agua [18]. *G niger* mostró una tolerancia similar al reportado para tallo y raíz en diversas especies vegetales [11].

Efecto de níquel sobre el peso y longitud de la raíz y tallo de *G. niger*.

En el caso de níquel se observo un efecto dependiente de la concentración, tanto en peso como en la longitud de raíz y tallo de las plántulas. El desarrollo radicular es la parte más sensible de la plántula. Así, a concentraciones de 155 ppm, el peso del tallo no muestra diferencias significativas con el control negativo, mientras que para la raíz, su crecimiento disminuye en alrededor del 40%. Un efecto similar se observa para la longitud de tallo. A concentraciones mayores de 774 ppm se observa una disminución en ambas variables, y a concentraciones mayores de 1083 ppm el efecto es letal.

Diferentes estudios han demostrado el efecto tóxico del níquel sobre la masa húmeda de la planta, con un comportamiento dependiente de la dosis que origina cambios morfológicos y bioquímicos asociados a alteraciones en la fotosíntesis, respiración, asimilación y transporte mineral, equilibrio hídrico y estrés oxidativo [19,20, 21].

Estudios en *V. bombyciferum* encontraron que a concentraciones de 272 y 679 ppm el tallo no presenta diferencias significativas respecto al control, pero con valores superiores a 679 ppm el desarrollo es sobre el tallo, aunque a concentraciones más elevadas, el efecto se observa en ambos órganos y a concentraciones superiores el efecto es letal. Comportamiento similar al presentado por *G. niger*.

Efecto de zinc sobre el peso y longitud de la raíz y tallo de *G. niger*.

El efecto del zinc en el peso y la longitud de tallo y raíz reporto mayor susceptibilidad en la raíz al efecto de este MP. A concentraciones menores de 841 ppm, *G. niger* sufre una pequeña reducción no significativa, conforme la concentración se incrementan a 841, 1402, 1963 ppm, las diferencias presentes son significativas, alcanzado un 80-90% de inhibición en la raíz a 2523 ppm.

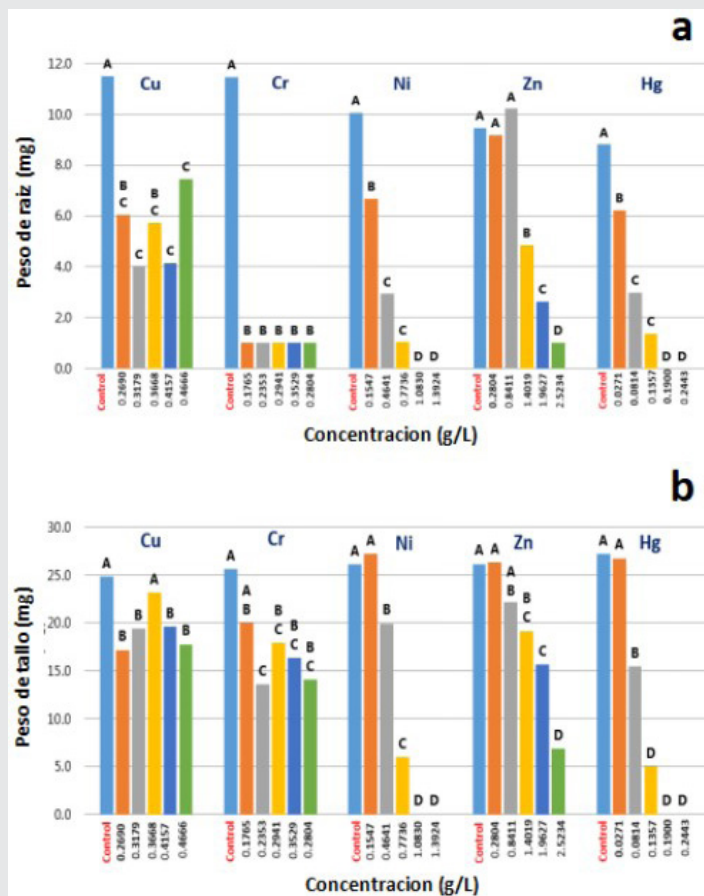


Figura 2. Efecto de metales pesados sobre el peso de raíz y tallo en *G. niger*. En grafica de barras se presentan los promedios del peso de raíz (a) y tallo (b) a concentraciones crecientes de los MP evaluados. Las concentraciones de cada metal: $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 269, 318, 367, 416 y 465 ppm, $K_2Cr_2O_7$; 177, 235, 294, 353 y 412 ppm, $NiSO_4$; 155, 464, 774, 1083 y 1392 ppm, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 280, 841, 1402, 1963 y 2523 ppm y $HgCl_2$; 27, 81, 136, 190 y 244. Las diferencias significativas se indican en la parte superior de cada barra, letras similares indican que no hubo diferencia significativa $p < 0.05$.

Los efectos de zinc involucran cambios en la arquitectura celular de la raíz, disminución en proliferación celular y daño en las células de los extremos terminales de la raíz, así como un incremento de especies reactivas de oxígeno. Diversos estudios en una variedad de plantas que incluyen *Trigonella foenum-graceum* L, *Triticum aestivum* L, *Medicago sativa* L., así como otras especies, reportan similar comportamiento a pesar de las diferencias en los diseños experimentales aplicados [22,23], sin embargo *G. niger*, presenta tolerancia a concentraciones superiores a las reportadas en estos estudios, lo que la ubica como candidata potencial para estudios de biorremediación de suelos contaminados por zinc.

Efecto de mercurio sobre el peso y longitud de la raíz y tallo de *G. niger*.

El mercurio presentó efecto significativo en el peso

y longitud de tallo y raíz dependiente de la dosis, con excepción del peso y longitud del tallo a los 27 ppm. Esta disminución drástica del peso y la longitud a las demás concentraciones, corrobora la naturaleza tóxica de este metal reportada en diversos estudios previos y los efectos nocivos sobre los seres vivos.

La toxicidad de mercurio ha sido asociada a cambios en la permeabilidad de la membrana, cambios en la reactividad de grupos sulfhidrilo, gran afinidad por ADP o ATP y el reemplazamiento de iones esenciales. [21]

Sin embargo, *G. niger* tolera concentraciones ligeramente más altas que las reportadas para otras especies y será necesario un mayor estudio para determinar los mecanismos que presenta esta semilla para resistir concentraciones moderadamente altas de mercurio.

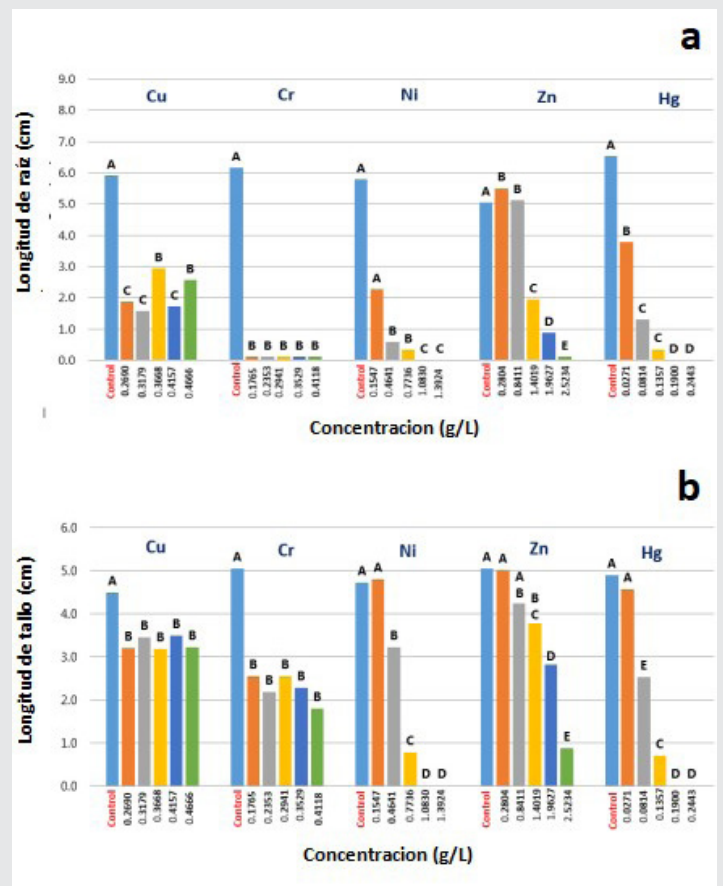


Figura 3. Efecto de metales pesados sobre la longitud de raíz y tallo en *G. niger*. En grafica de barras se presentan los promedios de la longitud de raíz (a) y tallo (b) a concentraciones crecientes de los MP evaluados. Las concentraciones de cada metal: $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 269, 318, 367, 416 y 465 ppm, $K_2Cr_2O_7$; 177, 235, 294, 353 y 412 ppm, $NiSO_4$; 155, 464, 774, 1083 y 1392 ppm, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; 280, 841, 1402, 1963 y 2523 ppm y $HgCl_2$; 27, 81, 136, 190 y 244. Las diferencias significativas se indican en la parte superior de cada barra, letras similares indican que no hubo diferencia significativa $p < 0.05$.

CONCLUSIONES

Las semillas de *G. niger* mostraron cierta tolerancia a la germinación frente a diferentes concentraciones de Cu, Cr y Zn, sin embargo los efectos fueron severos para los MP Ni y Hg.

El cobre compromete el desarrollo radicular de *G. niger* a concentraciones de 269 a 412 ppm, en forma independiente de la concentración en *G. niger*. El cromo no afecta la germinación de la semilla, sin embargo, en la plántula los efectos son severos, disminuyendo la longitud de tallo y raíz.

El zinc afecta la germinación en forma dependiente de la concentración. *G. niger* es susceptible a los metales pesados mercurio y níquel en forma dependiente de la concentración, sin embargo presenta una tolerancia moderada a mercurio.

G. niger es una planta con potencial para ser evaluada en estudios de fitoremediación de suelos contaminados con Cu, Cr y Zn.

BIBLIOGRAFÍA

[1] Kılıç, Z. (2020). *The importance of water and conscious use of water*. *International Journal of Hydrology*, 4(5): 239-241.

[2] Emile, R., Clammer, J. R., Jayaswal, P., & Sharma, P. (2022). *Addressing water scarcity in developing country contexts: a socio-cultural approach*. *Humanities and Social Sciences Communications*, 9(1): 1-10.

[3] Sharma, R., Agrawal, P. R., Kumar, R., & Gupta, G. (2021). *Current scenario of heavy metal contamination in water*. *Contamination of Water*, 49-64.

[4] Nagajyoti, P. C., Lee, K. D., & Sreekanth, T. V. M. (2010). *Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review*. *Environmental Chemistry Letters*. 8(3): 199-216.

[5] Rai, P. K., Lee, S. S., Zhang, M., Tsang, Y. F., & Kim, K. H. (2019). *Heavy metals in food crops: Health risks, fate, mechanisms, and management*. *Environment International*, 125: 365-385.

[6] Lascurain, M., Avendaño, S., Aníbal, A., & Niembro, A. (2010). *Guía de frutos silvestres comestibles en Veracruz (Fondo Sect)*.

[7] Hernández-Domínguez E., F.J. Gabino R. F.J., H.P. Medorio G. H. P., Ortega M. A.C., Nila-Méndez A.G. (2020) *Potencial biotecnológico del cultivo in vitro de Gonolobus niger, componente de bebida prehispánica denominada "Popo"*. *Journal Coloquio de Investigación Multidisciplinaria*. Vol. 8, Núm. 1

[8] Jeromini, T. S., Muniz, R. A., Silva, G. Z. D., & Martins, C. C. (2019). *The envelope method and substrate wetting in the germination test of onion seeds*. *Revista Ciência Agronômica*. 50: 169-176.

[9] Iqbal, M. Z., Nayeb, S., & Shafaq, M. (2018). *Effects of copper on seed germination and seedling growth performance of Lens culinaris Medik*. *Journal of Plant Development*, 25: 85.

[10] Singh D, Nath K and Sharma YK (2007). *Response of wheat seed germination and seedling growth under copper stress*. *Journal Environmental Biology*. 28:409-414.

[11] Joshi N, Menon P, Joshi A. (2019) *Effect of chromium on germination in some crops of India*. *J Agric Sci Bot*. 3(1):1-5.

[12] Pokorska-Niewiada, K., Rajkowska-Myśliwiec, M., & Protasowicki, M. (2018). *Acute lethal toxicity of heavy metals to the seeds of plants of high importance to humans*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 101(2): 222-228.

[13] Shweti, Ashok Kumar and JS Verma (2018). *Effects of nickel chloride on germination and seedling growth of different wheat (Triticum aestivum L. em Thell.) cultivars*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 7(4): 2227-2234.

[14] Balafrej, H., Bogusz, D., Triqui, Z. E. A., Guedira, A., Bendaou, N., Smouni, A., & Fahr, M. (2020). *Zinc hyperaccumulation in plants: A review*. *Plants*. 9(5): 562.

[15] Israr M, Sahi S, Datta R, Sarkar D (2006) *Bioaccumulation and physiological effects of mercury in Sesbania drummonii*. *Chemosphere*. 65:591-598.

[16] Mohammed nasser and Al-yemeni (2001). *Effect of cadmium, mercury and lead on seed germination and early seedling growth of vigna ambacensis l*. *Plant Physiol*. 6(2): 147-151.

[17] Gautam, S., Anjani, K., & Srivastava, N. (2016). *In vitro evaluation of excess copper affecting seedlings and their biochemical characteristics in Carthamus tinctorius L.(variety PBNS-12)*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 22(1): 121-129.

[18] Murtaza S., Parveen N., Murtaza S., Iqbal M.Z., Shafiq M., Kabir M. and Farooqi Z.R. (2017) *Effects of Chromium on seed germination, growth and yield of pink lentil*. *Bioscience Research* 14(4): 1246-1252.

[19] Al-Muwayhi, M. A. (2021). Morpho-physiological and molecular responses of cowpea (*Vigna sinensis* L.) to nickel toxicity. *Applied Ecology and Environmental Research*. 19(3): 2171-2188.

[20] Kumar, A., & Verma, J. S. (2018). Effects of nickel chloride on germination and seedling growth of different wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell.) cultivars. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 7(4): 2227-2234.

[21] Llamas, A., Ullrich, C. I., Sanz, A. (2008): Ni²⁺ toxicity in rice: Effect on membrane functionality and plant water content. *Plant Physiology and Biochemistry*. 46: 905-910.

[22] Yahaghi, Z., Shirvani, M., Nourbakhsh, F., & Pueyo, J. J. (2019). Uptake and effects of lead and zinc on alfalfa (*Medicago sativa* L.) seed germination and seedling growth: Role of plant growth promoting bacteria. *South African Journal of Botany*, 124, 573-582.

[23] Tao, L., Guo, M. Y., Xu, D., & Ren, J. (2014). Effect of zinc on seed germination, coleoptile growth and root elongation of six pulses. In *Applied mechanics and materials*. 618: 339-343.

[24] Iqbal, M. Z., Shafiq, M., & Athar, M. (2014). Phytotoxic effects of mercury on seed germination and seedling growth of *Albizia lebbek* (L.) Benth. (Leguminosae). *Advances in Environmental Research*. 3(3): 207-216.